UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

Vývoj metodologie a studium odpovědi *Hypsibius dujardini* na stresové faktory

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	**Hana Bendová**
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**Mgr. Dominik Vítek**
Termín odevzdání práce:	2022

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Hana Bendová
Název práce	Vývoj metodologie a studium odpovědi *Hypsibius dujardini* na stresové faktory
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Mgr. Dominik Vítek
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	Želvušky jakožto jedny z nejodolnějších organismů na Zemi patří k modelům často využívaným při studiu rezistence vůči stresovým faktorům. Tato práce se zabývá studiem odpovědi želvušek druhu *Hypsibius dujardini* vystavovaných zvýšené teplotě, oxidativnímu stresu, azidu sodnému. V rámci studia stresové odpovědi byly optimalizovány primery pro housekeeping a rezistenční geny želvušek. Součástí práce byla také anotace souboru snímků živých a mrtvých želvušek, která vedla k vytvoření neuronové sítě schopné rozpoznávat živé a mrtvé želvušky.
Klíčová slova	Želvušky, *Hypsibius dujardini*, neuronová síť, stresové faktory.
Počet stran	49
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Hana Bendová
Title of thesis response in	Study and methodology development of stress *Hypsibius dujardini*
Type of thesis	Bakalářská
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine
Supervisor	Mgr. Dominik Vítek
The year of presentation	2022
Abstract	As one of the most resistant organisms on Earth, Tardigrades are often used in stress tolerance research. The thesis deals with the study of stress response in *Hypsibius dujardini* exposed to temperature stress, oxidative stress, sodium azide. To study the stress response, primers for housekeeping and resistant genes of Tardigrades were optimized. As a part of the thesis, a set of images of live and dead Tardigrades, which led to the creation of a neural network capable of recognizing live and dead Tardigrades.
Keywords	Tardigrades, *Hypsibius dujardini*, neural network, stress factors.
Number of pages	49
Number of appendices	1
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval(a) samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 8.8.2022 Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu Mgr. Dominiku Vítkovi za odborné vedení, cenné rady, pomoc v laboratoři a veškerý čas, který mi při psaní této práce věnoval. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D. za přípravu neuronové sítě a pomoc při analýze vzorků.

Obsah

Seznam použitých zkratek 8
1. Úvod 9
2. Cíle práce 10
3. Želvušky 11
3.1. Anatomie 12
3.2. Ekologie 14
3.3. Obranné mechanismy 14
3.3.1. Kryptobióza 14
3.3.1.1. Anhydrobióza 15
3.3.1.2. Osmobióza 17
3.3.1.3. Anoxybióza 17
3.3.1.4. Kryobióza 17
3.3.1.5. Teplota 18
3.3.1.6. Oxidační stres 19
3.3.2. Diapauza 20
3.3.2.1. Zapouzdření 20
3.3.2.2. Cyklomorfóza 20
3.4. Taxonomie 21
4. Neuronová síť 22
4.1. Stavba neuronových sítí 22
4.2. Konvoluční neuronové sítě 23
4.2.1. Konvoluční vrstvy 24
4.2.2. Pooling vrstvy 25
4.2.3. Plně propojené vrstvy 25
4.3. Trénování neuronových sítí 26

5. Materiál a metody 27
5.1. Biologický materiál a použité chemikálie 27
5.2. Přístrojové a laboratorní vybavení 27
5.3. Kultivace a odebírání želvušek 28
5.4. Testování rezistence k stresovým faktorům 28
5.4.1. Teplota 28
5.4.2. Peroxid vodíku 29
5.4.3. Azid sodný 30
5.5. Izolace RNA 30
5.6. RT-PCR 31
5.7. Anotace učebního souboru pro neuronovou síť 31
5.8. Výsledky 33
5.8.1. Hodnocení rezistence k stresovým faktorům 33
5.8.2. Optimalizace primerových párů 34
5.8.3. Neuronová síť 37
5.9. Diskuze 41
5.10. Závěr 44
6. Použitá literatura 45
7. Přílohy 49

Seznam použitých zkratek

ANN – artificial neural network, umělá neuronová síť

CAHS – cytoplasmic abundant heat soluble proteins, teplem rozpustné proteiny hojné v cytoplazmě

CNN – convolutional neural network, konvoluční neuronová síť

HSP – heat shock proteins, proteiny teplotního šoku

INAs – ice-nucleating agents, led tvořící částice

LD50 – koncentrace, při které dochází k úhybu 50 % jedinců

LT50 – teplota, při které dochází k úhynu 50 % jedinců

LEA – late embryogenesis abundant proteins, proteiny hojné při pozdní embryogenezi

ROS – reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku

SAHS – secretory abundant heat soluble proteins, teplem rozpustné proteiny hojné v sekretech

1. Úvod

Želvušky jsou mikroskopičtí živočichové, kteří obvykle nepřesahují délku 1 mm. Vyskytují se po celém světě ve vodním i suchozemském prostředí, nicméně všechny druhy jsou závislé na přítomnosti vody, z toho důvodu se suchozemské želvušky vyskytují převážně na mechorostech a lišejnících. Jejich výjimečnost spočívá především v toleranci k extrémním podmínkám. Běžnou adaptací vyskytující se u těchto živočichů je kryptobióza, označována jako vratný ametabolický stav vyvolaný nepříznivými podmínkami prostředí. Typicky rozeznáváme čtyři druhy fyzikálních stresorů, které vyvolávají různé typy kryptobiózy: dehydratace (anhydrobióza), nízké teploty (kryobióza), nedostatek kyslíku (anoxybióza) a vysoká koncentrace soli (osmobióza) (Møbjerg et al., 2011). Díky těmto adaptacím jsou želvušky ve vědě využívány jako modelové organismy pro studium rezistence.

Neuronové sítě patří mezi výpočetní modely umělé inteligence, jejichž vlastností je mimo jiné obrazová analýza, která jim umožňuje detekovat daný objekt a zařadit ho do určité kategorie. Díky tomu mají neuronové sítě využití v biologických oborech, kdy zprostředkovávají například automatickou identifikaci různých typů buněk z mikroskopických snímků na základě jejich morfologie (Kusumoto & Yuasa, 2019). Této vlastnosti by mohlo být využito i v případě experimentů zabývajících se studiem odpovědi želvušek na stresové faktory. Při experimentech je nezbytné pracovat s velkým množstvím zvířat, což je časově náročné pro následné vyhodnocování. Zavedením neuronových sítí do vyhodnocovacího procesu, které by na základě morfologie želvušek rozpoznávaly mrtvé a živé jedince, by mohlo vyhodnocování časově usnadnit.

2. Cíle práce

Vypracovat literární rešerši na téma rezistence želvušek ke stresovým faktorům a neuronové sítě

Experimentálně otestovat rezistenci želvušek druhu *Hypsibius dujardini* proti stresovým faktorům

Anotace učebního souboru pro neuronovou síť schopnou rozpoznávat želvušky druhu *Hypsibius dujardini* a jejich fenotypy

Optimalizace primerů housekeeping a rezistenčních genů u želvušky druhu *Hypsibius dujardini*

3. Želvušky

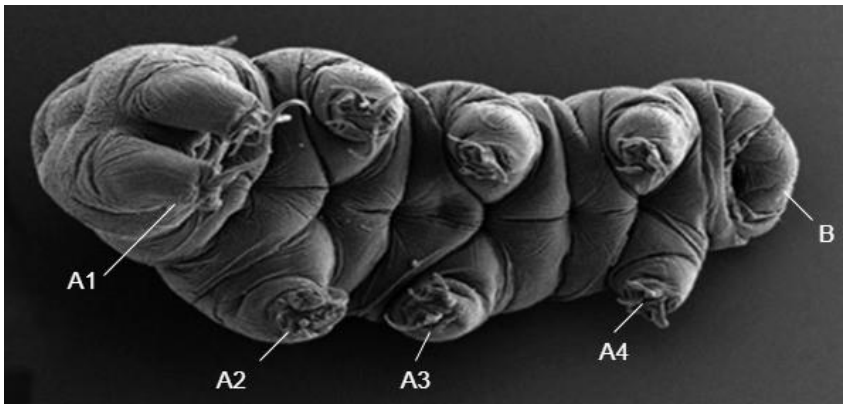
Tardigrada neboli želvušky jsou mikroskopičtí vodní živočichové, kteří dosahují velikosti od 0,05 do 1,5 mm. Kromě mořských a sladkovodních prostředí se mohou vyskytovat taky na souši, především v mechách a lišejnících (Förster et al., 2009). Jsou k nalezení na stanovištích po celém světě od horkých pramenů až po ledovce. Druhy žijící ve vodě jsou většinou průsvitné bílé barvy, zatímco suchozemské druhy bývají barevné (zelené, hnědé, žluté, oranžové, růžové, červené, fialové nebo černé) (Glime 2017). Jsou kmenem mnohobuněčných živočichů s vysokou odolností vůči enviromentálnímu stresu (Förster et al., 2009).

Poprvé byly popsány v roce 1773 německým zoologem Johannem A. E. Goezem, který je pojmenoval malí vodní medvědi. Názvem Tardigrada (z latinského *tardigradus*), pod kterým jsou známy dnes, byly pojmenovány v roce 1776 italským přírodovědcem Lazzarem Spallanzanim pro svůj pomalý, želvovitý pohyb (Møbjerg et al., 2011, Nelson et al., 2010). Želvušky patří do skupiny Ecdysozoa, nicméně stále není jasné, zda je skupina více příbuzná členovcům (A*rthropoda*) a drápkovcům (*Onychophora*) nebo hlísticím (*Nematoda*) a strunovcům (*Nematophora*) (Møbjerg et al., 2011).

Želvušky jsou proslulé svou schopností snášet různé extrémní podmínky včetně vysušení, osmotického šoku a vystavení vesmírnému vakuu a kosmickému záření (Møbjerg & Neves, 2021). Od chvíle, kdy byla prokázána jejich schopnost odolávat stresovým faktorům spojených s cestami do vesmíru, se v kombinaci s jejich relativně složitou strukturou a snadným pozorováním staly ideálním modelovým organismem pro výzkum vesmíru. Tento taxon je proto nyní v centru pozornosti astrobiologů z celého světa. Na základě návrhů výzkumníků bylo v posledních letech uskutečněno několik vesmírných programů zaměřených na želvušky. Jedním z příkladů je projekt TARDIS (tardigrada in space), jehož cílem bylo ověřit, zda jsou želvušky druhu *Milnesium tardigradum* a *Richtersius coronifer* schopny přežít podmínky otevřeného vesmíru. Experimenty ukázaly, že želvušky mohou přežít vystavení kosmickému vakuu, ale přidání faktorů, jako je UV sluneční záření, ionizující slunečné záření a galaktické kosmické záření výrazně snížilo jejich míru přežití (Weronika & Łukasz, 2017).

3.1. Anatomie

Tělo želvušek je bilaterálně symetrické, rozděleno do pěti segmentů a 4 párů končetin zakončenými drápky (Weronika & et Łukasz, 2017, Nelson et al., 2010). Na prvním segmentu je hlava, následují 3 trupové segmenty, z nichž každý nese jeden pár nesegmentovaných nohou, a kaudální segment se čtvrtým párem nohou směřujících dozadu, jak je znázorněno na obrázku číslo 1 (Nelson et al., 2010). Tělo mají pokryté pružnou kutikulou, která může být hladká nebo pokrytá výběžky (Weronika & Łukasz, 2017). Kutikula je důležitá při taxonomickém rozpoznávání rodů a druhů, tvoří základ pro rozdělení želvušek do dvou existujících tříd Eutardigrada a Heterotardigrada. Třída Heterotardigrada zahrnuje především mořské a obrněné suchozemské želvušky, zatímco Eutardigrada se skládají z neobrněných sladkovodních a ostatních suchozemských druhů. Obrněné želvušky jsou takové, které mají zesílenou hřbetní kutikulu rozdělenou do jednotlivých desek, které se mezi různými rody a druhy liší počtem a tvarem. U Heterotardigrad mohou být kromě kutikulárních desek na těle přítomny další výběžky jako vlákna, trny a papily. Neobrněné želvušky mají tenkou hladkou kutikulu, která může být vytvarovaná, ale není rozdělena do desek (Nelson et al., 2010).



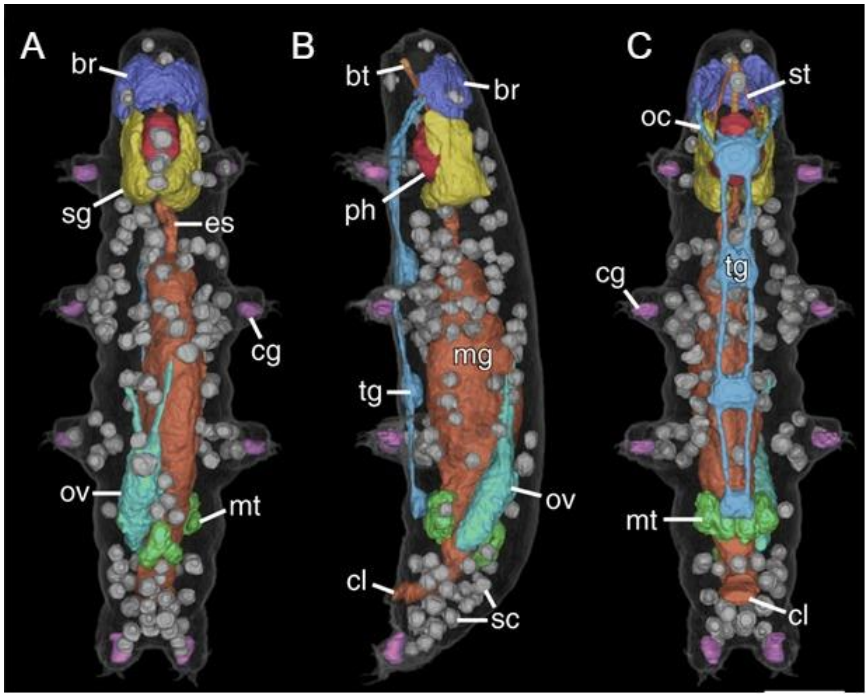
Obrázek č. 1: Stavba těla *Hypsibius dujardini* pod rastrovacím elektronovým mikroskopem, ventrální pohled na 4 páry nohou (A1-A4) a hlavu (B). Měřítko 10 μm, převzato a upraveno podle (Tenlen et al., 2013).

Zažívací systém mají plně vyvinutý a v závislosti na druhu přizpůsobený k přijímání potravy v podobě řas, bakterií, buněk hub nebo malých bezobratlých, kterými mohou být například vířníci, hlístice nebo i jiné želvušky. Nervový systém mají složený z mozku v podobě prstenců kolem úst a z břišního řetězce se segmentovými gangliemi (Weronika & et Łukasz, 2017).

Trávicí systém je tvořen předním, středním a zadním střevem, přičemž střední i zadní střevo mají kutikulární výstelku. Zadní střevo je rozděleno na konečník a kloaku. Střední střevo tvoří největší část trávicího traktu. Eutardigrada mají rozsáhlé střední střevo a tři osmoregulační žlázy, označovány jako Malfigiho orgány. Heterotardigrada naopak mají laločnaté střední střevo, ale postrádají osmoregulační žlázy. Zadní střevo přijímá obsah středního střeva a jeho hlavní funkcí je úprava moči z Malfigiho orgánů (Nelson et al., 2010). Jednotlivé orgány jsou znázorněny níže na obrázku číslo 2.

Svalový systém je složen z dorsálních a ventrálních podélných vláken, příčných svalů pro pohyb nohou, styletových svalů, hltanových a střevních svalů a svalů pro vyprazdňování a ukládání vajíček (Nelson et al., 2010).

Specializované dýchací a oběhové systémy chybí, dýchání tedy probíhá skrze pokožku. Cirkulaci zajišťuje pohyb tekutin coelomocytů v tělní dutině při pohybu živočicha (Nelson et al., 2010).



Obrázek č. 2: Zobrazení rentgenového nanoCT snímku celého těla a orgánů *Hypsibius dujardini* v dorzálním (A), laterálním (B) a ventrálním (C) zobrazení. Zkratky: br – mozek, bt – bukální trubice, cg – drápové žlázy, cl – kloaka, es – jícen, mg – střední střevo, mt – malphigiho trubice, oc – vnější spojovací prvky, ov – vaječník, ph – hltan, sg – slinné žlázy, sc – zásobní buňky, tg – kmenový ganglion. Měřítko 20 μm, převzato z Gross et al., 2019.

3.2. Ekologie

Výskyt želvušek je zaznamenán po celém světě ve sladkovodním, suchozemském i mořském prostředí (Nelson et al., 2018). Nacházejí se na každém kontinentu v biotopech od horkých pramenů až po vrstvy pod ledem (Glime, 2017). Většina popsaných druhů pochází ze suchozemských prostředí, nicméně všechny želvušky musí být obklopeny vrstvou vody, aby přežily (Nelson et al., 2018). Vodu potřebují k nalezení potravy, k dýchání, rozmnožování a k pohybu (Miller 1997). Z toho důvodu žijí nejčastěji na mechorostech, lišejnících, řasách a dalších rostlinách, na kterých se drží vodní kapky. Druhy závislé na vodní vrstvě jsou nazývány limnoterestriální, tedy žijící v suchozemských biotopech, ale vyžadující vodu (Glime 2017).

3.3. Obranné mechanismy

Kromě vysychání, které pro želvušky obývající mechorosty představuje nebezpečí, může být organismus vystaven například vysokým nebo nízkým teplotám, nedostatečnému množství kyslíku a UV záření. S malou schopností pohybovat se potřebují jiný typ ochrany (Glime, 2017).

Želvušky jakožto vodní organismy žijící na souši si proto vyvinuly ochranné mechanismy k přežití, jako je dormance. Dormance může být dvou typů – diapauza a kviescence. Diapauza je řízena endogenně, takže není přímo způsobována enviromentálními faktory. Její ukončení nemusí odpovídat obnovení příznivých podmínek prostředí. Naopak kviescence je řízena exogenně, je tedy přímo vyvolávána nepříznivými faktory prostředí a je ukončena až po jejich odeznění. Některé organismy včetně želvušek jsou schopny extrémní formy kviescence nazývané kryptobióza. Kryptobióza se pak dělí na anhydrobiózu, kryobiózu, anoxybiózu a osmobiózu. Diapauza se projevuje zapouzdřením, cyklomorfózou a tvorbou odolných vajíček (resting eggs) (Guidetti et al., 2011).

3.3.1. Kryptobióza

Poprvé byla kryptobióza popsána v roce 1702 Anthonym van Leuwenhoekem, ale teprve v roce 1959 byla Davidem Keilinem zavedena jako termín. Jedná se o reverzibilní ametabolický stav, který může být vyvolán nepříznivými podmínkami, jako je například

dehydratace a ochlazení. V tomto stavu je organismus schopen přežít nepříznivé podmínky s vynaložením malého množství energie, metabolismus je extrémně snížen, nebo se úplně zastaví (Glime, 2017).

S kryptobiózou se můžeme setkat u dvou typů organismů. Za prvé se jedná o živočichy a rostliny, kteří kryptobiózu provozují pouze v raných vývojových stádiích. Jedná se například o spory bakterií a hub, semena vyšších rostli a larvy některých druhů hmyzu. Druhou skupinou jsou organismy, které mohou do kryptobiózy vstoupit v jakékoli fázi jejich života. Tato kategorie zahrnuje některé bakterie a tři skupiny bezobratlých – vířníky, hlístice a želvušky (Crowe & et Cooper, 1971).

3.3.1.1. Anhydrobióza

Nejběžnější formou kryptobiózy je anhydrobióza – stav dormace způsobený dehydratací (Glime, 2017). V tomto stavu mohou želvušky zůstat neaktivní během nepříznivých podmínek způsobených nedostatkem vody, vysokou teplotou nebo zářením. Kromě toho jsou schopny přečkat i působení různých chemických látek jako je ethanol, sirovodík a oxid uhličitý (Weronika & et Łukasz, 2017). Anhydrobióza je obvykle omezena na živočichy, kteří dosahují délky kratší než 1 mm, proto jsou někteří bezobratlí schopni dostat se do toho stavu pouze během raných vývojových stádií. Nicméně želvušky a vířníci obvykle dosahují velikosti menší než 1 mm a jsou schopni anhydrobiózy v jakékoli vývojové fázi. Aby mohly tento stav přežít, musí vyschnout velmi pomalu (Glime, 2017).

Vstupu do anhydrobiózy předchází přípravná fáze, během níž tělo želvušky prochází řadou metabolických a anatomických změn, které jsou nezbytné pro přežití nepříznivých podmínek (Weronika & et Łukasz, 2017). Jakmile začne docházet k vypařování vody obklopující živočicha, želvuška se stáhne, zatáhne hlavu a končetiny a zaujme charakteristickou nepohyblivou formu zvanou soudeček. Ztratí většinu vody (více než 95 %) a silně sníží nebo až pozastaví svůj metabolismus (Nelson et al., 2010). Tato forma zmenšuje povrch pro odpařování a tím zpomaluje ztráty kapalné vody (transpirace se snižuje asi o 50 %) (Weronika & et Łukasz, 2017). Ve formě soudečku mohou želvušky kromě dlouhotrvajícího sucha snášet také vystavení toxickým chemikáliím, nízké teploty pod bodem mrazu, vakuum, vysoký tlak, radiaci, extrémní pH, anoxii a vysoké teploty (Møbjerg et al., 2011).

Pomalé vysychání je nezbytné kvůli syntéze membránových protektantů (Glime, 2017). Jakmile se z těla želvušky odpaří veškerá volná voda, začne proces nahrazování vody vázané na makromolekuly. Ztracená voda je nahrazena bioprotektanty, které chrání makromolekuly jako jsou nukleové kyseliny a proteiny před ztrátou jejich správné struktury (Weronika & et Łukasz, 2017). Stejně jako hlístice a vířníci, některé želvušky se na vysychání připravují produkováním disacharidů trehalosy a sacharosy. Tyto disacharidy jsou společně s glycerolem využity jako membránové protektanty. Než vstoupí do kryptobiotického stavu, musí být tyto látky syntetizovány ze zásob glykogenu, což vyžaduje výše zmíněné přípravné období (Glime, 2017).

Trehalosa a sacharosa chrání buňky a biomolekuly tím, že (1) nahrazují vodu, která je normálně vázána na vodík, (2) podílí se na tvorbě sklovité matrice v cytoplazmě a (3) pomáhají při stabilizaci sušené DNA (C. Wang et al., 2014). Nahrazení vody cukry brání radiaci z ionizace a zabraňuje krystalizaci, což želvušky chrání během mrznutí (Glime, 2017). Trehalosa však není lékem na všechny efekty vysychání. Vysoké teploty a vlhkost vzduchu mohou vést k jejímu zničení (Glime, 2017). Množství trehalosy zjištěné u želvušek (až 2,3 % sušiny) je mnohem nižší ve srovnání s množstvím zjištěným u jiných anhydrobiotických organismů, jako jsou embryonální vajíčka (cysty) korýšů *Artemia* (asi 15 % sušiny) a larvy afrického komára *Polypedilum vanderplanki Hinton* (asi 20 % sušiny). Zdá se proto nepravděpodobné, že by akumulace trehalosy představovala jedinečný biochemický mechanismus, který želvuškám umožňuje tolerovat extrémní vysušení (Guidetti et al., 2011).

Dalšími molekulami, které se podílejí na ochraně buněk želvušek během anhydrobiózy jsou proteiny teplotního šoku (HSP), proteiny hojné při pozdní embryogenezi (LEA), teplem rozpustné proteiny hojné v cytoplazmě (CAHS), teplem rozpustné proteiny hojné v sekretech (SAHS) a akvaporiny (Weronika & et Łukasz, 2017).

HSP pravděpodobně fungují jako molekulární chaperony a mohou napomáhat skládání nově syntetizovaných proteinů, kontrolovat jejich konečné intracelulární umístění, chránit je před denaturací spojenou se stresem a napomáhat renaturaci (Weronika & et Łukasz, 2017, Møbjerg et al., 2011).

Proteiny LEA mají podobnou funkci jako trehalosa, ale kromě ochrany buněčných membrán a proteinů mohou působit také jako hydratační pufr a sekvestrovat ionty. Mohou

být také zodpovědné za ochranu buněčné struktury prostřednictvím renaturace nesložených proteinů (Weronika & et Łukasz, 2017).

Proteiny CAHS a SAHS pravděpodobně tvoří molekulární štít v podmínkách nedostatku vody. Akvaporinové proteiny mohou hrát menší roli při anhydrobióze tím, že dolaďují transport vody a výrazně zvyšují propustnost membrán (Weronika & Łukasz, 2017).

3.3.1.2. Osmobióza

Další formou kryptobiózy je osmobióza, která umožňuje některým druhům tolerovat slaná prostředí. Nastává v případě, kdy je koncentrace vnější soli vyšší než koncentrace uvnitř organismu. Stejně jako u anhydrobiózy dochází k tvorbě soudečku. Osmobióza se nicméně nepovažuje na nezbytnou, protože některé druhy želvušek mají sami o sobě vysokou toleranci vůči osmolaritě (Glime, 2017).

3.3.1.3. Anoxybióza

Speciálním případem kryptobiózy je anoxybióza. Tento stav dormace umožňuje želvuškám přežít nedostatečné množství kyslíku. Na rozdíl od předchozích dvou typů, při anoxybióze nedochází k tvorbě soudečku. Nedostatek kyslíku vede k poruchám osmoregulace, což má za následek nadbytečnou absorpci vody. Želvuška se stává opuchlou, nepohyblivou a má dokonale bilaterálně symetrické tělo (Glime, 2017).

3.3.1.4. Kryobióza

Kryptobiózou, která želvuškám umožňuje přežít vystavování teplotám pod bodem mrazu je kryobióza. Tento druh rezistence je uskutečňován řízeným zmražením a umožňuje limnoterestriálním druhům obývat polární oblasti (Glime, 2017, Nelson et Guidetti 2010). Během kryobiózy želvušky zaujímají formu soudečku, která však není nutná pro přežití, protože želvušky jsou na rozdíl od většiny členovců tolerantní vůči mrazu. Schopnost snášet tyto podmínky vyžaduje buď toleranci mrznoucí vody v těle, nebo mechanismus, který snižuje teplotu bodu mrazu (Glime, 2017).

Tolerance vůči mrazu je umožněna díky led tvořícím částicím (ice-nucleating agents; INAs), které zabraňují nitrobuněčnému zmražení (Glime, 2017). Led tvořícími částicemi

mohou být proteiny nebo lipoproteiny o molekulové hmotnosti 74-800 kDa, které jsou umístěny vně buněk. Tyto částice vyvolávají heterogenní nukleaci ledu a mrznutí při teplotách mezi -5 °C a -10 °C. Teplotu, při které dochází k tvorbě ledu určuje velikost proteinu. Výsledkem je pomalé řízené mrznutí extracelulární tekutiny, které má za následek snížení osmotického šoku (Wright, 2001).

Snížení teploty bodu mrazu obstarávají kryoprotektanty. Tyto látky mohou být rozdělené do dvou skupin: nízkomolekulární kryoprotektanty a hysterezní proteiny. Mezi nízkomolekulární kryoprotektanty patří například glycerol, sorbitol, glukosa a trehalosa. Tato skupina má schopnost snižovat bod tání. Hysterezní proteiny se vážou na krystaly a brání tak následnému růstu ledu (Wright, 2001).

3.3.1.5. Teplota

Želvušky v kryptobiotickém stavu vykazují vysokou odolnost vůči extrémně vysokým i nízkým teplotám. Například u druhu *Adorybiotus coronifer* byly studovány účinky dlouhodobého vystavování vysoké teplotě a bylo zjištěno, že zatímco živočichové nepřežili 60minutové vystavení teplotě 100 °C, nedošlo téměř k žádnému nárůstu úmrtnosti, dokud teploty nepřekročily 70 °C, LT50 (teplota, při které je pozorována 50% úmrtnost) pro experimentální vzorek byla přibližně 76 ºC (Ramløv & Westh, 2001). V jiném experimentu bylo prokázáno, že Eutardigrada druhu *Macrobiotus hufelandi* přežily několikaminutové vystavování teplotám 120-125 ºC (Wright, 2001). V aktivním stavu jsou želvušky v závislosti na druhu a experimentálním přístupu citlivé na vysoké teploty s odhadovanými hodnotami LT50 v rozmezí 29–37 °C (Møbjerg & Neves, 2021).

Co se týče nízkých teplot, bylo zjištěno, že vysušené želvušky různých druhů přežily ponoření do kapalného vzduchu (-190 ºC) po dobu 21 měsíců, do kapalného dusíku (-253 ºC) po dobu 26 hodin a kapalného helia (-272 ºC) po dobu 8 hodin. Spojitost mezi anhydrobiózou a teplotami blízkými absolutní nule dokázal také Becquerel, kterému se podařilo oživit jedince po vystavování teplotě -272,8 ºC (Rebecchi et al., 2007).

V roce 1995 Sømme a Meier pozorovali vysoký stupeň přežití u některých druhů antarktických želvušek po 8 letech v -22 ºC, zatímco u jiných antarktických druhů (*Diphascon sp. a Diphascon sp. Hypsibius cf. Dujardini)* bylo pozorováno přežití při -80 ºC po dobu 6 let a 2 měsíců. V roce 2001 byly uchovávány vyschlé suchozemské druhy nasbírané v mírném podnebí při teplotě -80 ºC. Míra přežití *Richtersius coronifer* a *R.*

oberhaeuseri při této teplotě byla po 3 a 6 letech velmi vysoká (95 %). Oproti tomu míra schopnosti hydratovaných želvušek přežívat při nízkých teplotách je omezena na krátká období a klesá s dobou trvání vystavení nízkým teplotám (Wright, 2001). Ramløv a Westh zjistili, že hydratované exempláře *R. coronifer* přežijí ochlazení na -196 °C po dobu 15 minut, ale jejich životaschopnost klesá při rychlejším ochlazování (Ramløv & Westh, 1992).

3.3.1.6. Oxidační stres

Přestože kyslík představuje pro většinu organismů nezbytnou sloučeninu pro život, může mít tento prvek i škodlivé účinky. Nastává tak v případě, kdy dojde k nerovnováze mezi nadměrnou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a omezeným působením antioxidačních obranných látek, výsledkem této nerovnováhy je tzv. oxidační stres (Rebecchi, 2013).

Mezi ROS patří volné radikály kyslíku jako je například singletový kyslík ($^1O_2$), superoxid (O_2^-), nebo hydroxylový radikál (•OH). Jedná se o atomy nebo molekuly s nepárovým elektronem, který může být rychle odevzdán, což z nich činí vysoce reaktivní molekulární formy. Peroxid vodíku není volným radikálem, ale řadí se mezi ROS a je schopen vyvolat oxidační stres. Působením ROS může docházet k denaturaci proteinů a enzymů, poškození nukleových kyselin a peroxidaci lipidů, která způsobuje snížení tekutosti biologických membrán, což narušuje jejich propustnost během rehydratace (Rebecchi, 2013).

Anhydrobiotické organismy využívají dva způsoby obrany proti oxidačnímu stresu, jedná se o metabolickou kontrolu procesů produkujících i spotřebovávajících energii a o obranu pomocí antioxidantů. Obrana pomocí antioxidantů sestává z intracelulárních i extracelulárních molekul, které lze rozdělit na primární a sekundární obranné mechanismy. Složky primární skupiny zabraňují oxidačnímu stresu tím, že zachytí ROS dříve, než dojde k poškození molekuly. Naopak složky druhé skupiny jsou zastoupeny řadou enzymů, které opravují již vzniklá poškození. K enzymatickým antioxidačním reakcím však může docházet pouze v případě, kdy je k dispozici dostatečné množství vody, což bývá například během vstupní a výstupní fáze anhydrobiózy. Mezi antioxidanty potřebné pro toleranci vysychání u želvušek patří například glutathion, karotenoidy, peroxidázy, katalázy a superoxiddismutázy (Rebecchi, 2013).

3.3.2. Diapauza

Diapauza je běžná především mezi vodními druhy, ale setkáváme se s ní i u některých suchozemských druhů. Zatímco kryptobióza je pečlivě prostudovaná, role diapauzi není u želvušek příliš známá. Pravděpodobně se nejedná o nezbytnou součást životního cyklu, ale slouží pouze k přežití některých nepříznivých podmínek (Glime, 2017).

3.3.2.1. Zapouzdření

Zapouzdření bylo objeveno u některých želvušek žijících ve sladkých vodách, v mechu nebo v půdě. Želvušky v této formaci vykazují smrštěný oválný tvar zvaný cysty. Cysty se mohou lišit podle druhů i v rámci druhu jednoho. V zapouzdření mohou vydržet po dobu týdnů nebo několika měsíců (Guidetti et al., 2011).

Faktory vyvolávající tvorbu cyst nejsou známy, ale předpokládá se, že se jedná o stresující podmínky jako je nedostatek kyslíku, změna pH, kolísání teplot a znečištění. Cysty mají charakteristický stažený, oválný tvar se silnými kutikulárními vrstvami. Při jejich tvorbě dochází ke složitým morfologickým změnám, které začínají uvolněním sklerotizovaných částí bukálně-hltanového aparátu bez ztráty staré kutikuly. Následně dochází k postupnému syntetizování dvou až tří nových kutikul (Nelson et al., 2015).

Zapouzdřování je mnohem komplexnější než formace soudečku. Na rozdíl od anhydrobiotických želvušek, zapouzdření jedinci nejsou odolní vůči suchu ani vysokým teplotám, protože mají stálý obsah vody. Přesto mohou cysty přežívat v přírodě více než rok ze svých zásob (Glime, 2017).

3.3.2.2. Cyklomorfóza

Cyklomorfóza je cyklickou změnou morfologie a fyziologie, ke které dochází během životního cyklu u mořských želvušek druhu *Halobiotus crispae* (Guidetti et al., 2008).

Proces cyklomorfózy se skládá ze tří fází: aktivní fáze, fáze pseudosimplex 1 a fáze pseudosimplex 2. V první fázi je plně vyvinutý bukálně-hltanový aparát a gonády. Fáze pseudosimplex 1 je téměř nepohyblivá, vyskytuje se zde dvojitá kutikula, která blokuje ústa a kloaku a bukálně-hltanový aparát s gonádami jsou degenerované. Pseusodimplex 2 je stádiem pohlavního dozrávání, jedná se o velmi aktivní stadium, kde se již nevyskytuje stará kutikula a identifikační znaky (Nelson et al., 2015).

Cyklomorfóza pravděpodobně souvisí s lokalitou, ve které se daná populace nachází. Například stadium pseudosimplex 1 je odolné vůči mrazu, což je zřejmě adaptace na nízké teploty v Grónsku a pravděpodobně umožňuje živočichům snášet období nedostatku kyslíku a tepelný stres během léta v Dánsku. Cyklomorfóza může komplikovat identifikaci, zejména proto, že rozšíření tohoto jevu není známo (Nelson et al., 2015).

3.4. Taxonomie

Doposud bylo popsáno kolem tisíce druhů želvušek, které se dělí do tříd Eutardigrada, Heterotardigrada a Mesotardigrada. Do třídy Mesotardigrada patří pouze jeden druh – *Thermozodium esakii*, který byl objeven v japonských horkých pramenech. Lokalita tohoto druhu byla však zničena během zemetřesení a protože žádné další vzorky nebyly nikdy objeveny, považuje se třída za pochybnou. Zástupci třídy Eutardigrada dosahují délky 1 mm, obsahují hladkou kutikulu a dělí se do řádů Parachela a Apochela. Heterotardigrada jsou menší, délkou nepřesahují 500 μm a jejich kutikula je velmi různorodá. Heterotardigrada obsahují řád Arthrotardigrada, zahrnující většinu mořských druhů a řád Echiniscoidea, který obsahuje převážně suchozemské a pár mořských druhů (Gross et al., 2015).

4. Neuronová síť

V 50. letech 20. století začal vývoj umělé inteligence, jejímž cílem je napodobit schopnost lidského myšlení. Jedním z typů umělé inteligence je strojové učení. Strojové učení je proces využívající algoritmy pro klasifikaci a identifikaci vzorů z velkých souborů dat. Mezi strojové učení řadíme například hluboké učení využívající vícevrstvou neuronovou síť, která napodobuje strukturu lidského nervového obvodu (Kusumoto & Yuasa, 2019).

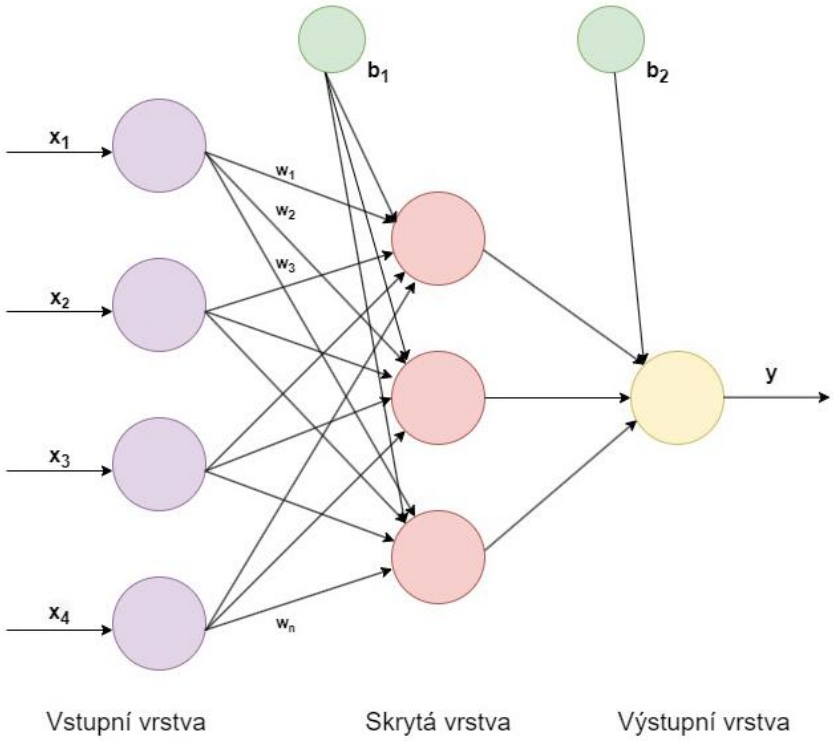
V roce 1943 neurolog Warren S. McCulloch a matematik Walter Pitts vydali článek s názvem „A logical calculus of ideas immanent in nervous activity“, ve kterém vysvětlují způsob fungování neuronů v mozku. Byli první, kteří představili matematický model neuronu jako základní spínací prvek mozku a položili tak základy pro konstrukci umělých neuronových sítí (ANN) (Ertel, 2017).

Neuronové sítě jsou jedním z výpočetních modelů používaných v umělé inteligenci. K vývoji jejich trénování přispělo v roce 2006 objevení techniky zvané hluboké učení, díky níž je neuronová síť schopna řešit problémy na základě učení se z pozorovaných dat (Nielsen, 2015).

4.1. Stavba neuronových sítí

Neuronové sítě jsou složeny z velkého počtu vzájemně propojených výpočetních uzlů označovaných jako neurony. Neurony tvoří vstupní vrstvu, skryté vrstvy a výstupní vrstvu, přičemž se společně učí ze vstupů, aby optimalizovaly konečný výstup (SC. Wang, 2003, O'Shea & Nash, 2015).

Pro objasnění fungování neuronových sítí je vhodné nejprve uvést pojem perceptron. Jedná se o typ umělého neuronu vyvinutý v 50. a 60. letech 20. století vědcem Frankem Rosenblattem, inspirovaným dřívější prací Warrena McCullocha a Waltera Pittse. Perceptron přijímá několik vstupů a generuje jeden výstup. Rosenblatt navrhl schéma pro výpočet výstupu; zavedl váhy (*weights*) - reálná čísla, která vyjadřují důležitost příslušných vstupů pro výstup. Každý neuron přijímá signály od předchozích neuronů a každý přijímaný signál má svou váhu. Pro každý neuron existuje kromě vah také tzv. bias hodnota, která se přičítá k vahám a ovlivňuje výstup. (Nielsen, 2015). Schéma neuronové sítě je znázorněno na obrázku číslo 3.



Obrázek č. 3: Schéma neuronové sítě tvořené čtyřmi neurony ve vstupní vrstvě, třemi neurony ve skryté vrstvě a jedním neuronem ve výstupní vrstvě. Přijímané vstupní signály jsou přes neurony ve skryté vrstvě přenášeny k neuronům ve výstupní vrstvě a výsledkem je výstup (y).

4.2. Konvoluční neuronové sítě

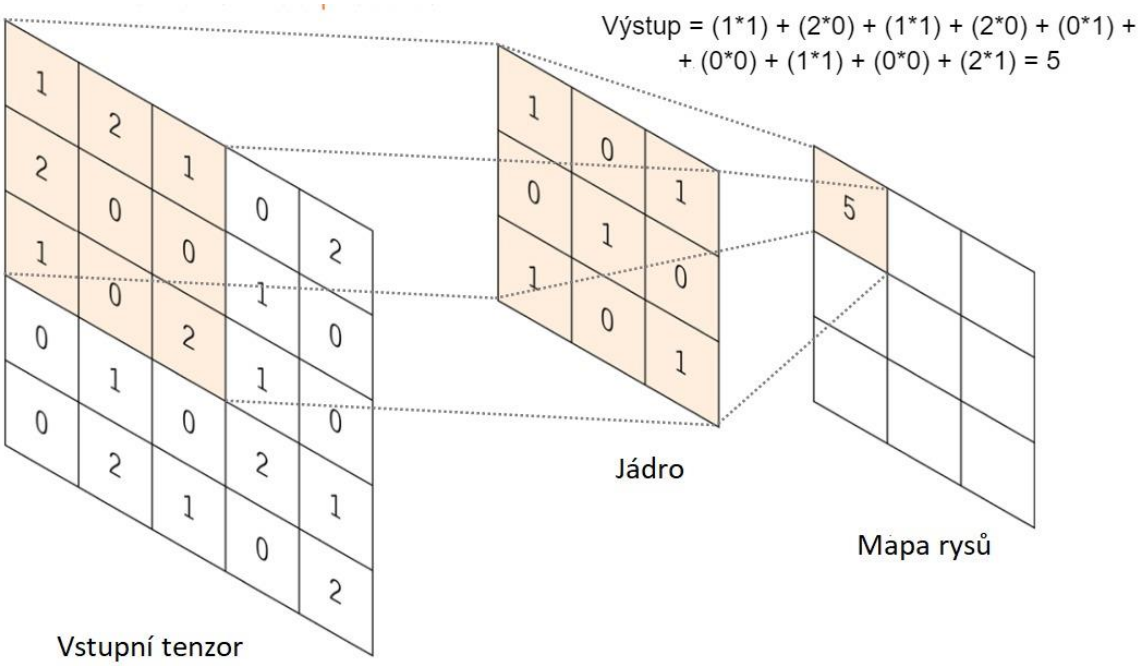
Tato práce se zabývá především konvolučními neuronovými sítěmi (CNN). Tento typ neuronových sítí se stejně jako ANN skládá z neuronů, které se samy optimalizují učením. (O'Shea & Nash, 2015). Jejich využití spočívá především v rozpoznávání vzorů v obrazech, kdy jsou schopny obraz zařadit do určité kategorie. Slouží také k detekci objektů, kdy systém kromě zařazení do kategorie obraz označí ohraničujícím rámečkem (Li et al., 2021). Kromě obrazové analýzy se používají i například k předpovědi počasí a lze je naučit rozpoznávat mluvenou řeč i ručně psaný text (Ertel, 2017).

CNN se tradičně skládají ze tří typů vrstev; konvoluční vrstvy, pooling vrstvy a plně propojené vrstvy. Ve vstupní vrstvě se nachází hodnoty pixelů obrazu (O'Shea & Nash, 2015).

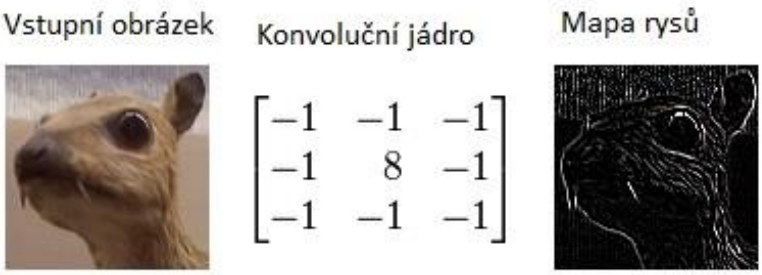
4.2.1. Konvoluční vrstvy

Klíčovou roli v CNN hrají konvoluční vrstvy, které provádějí extrakci rysů pomocí matematických operací zvaných konvoluce a aktivační funkce. V digitálních obrazech jsou hodnoty pixelů uloženy ve dvourozměrné mřížce (Yamashita et al., 2018).

Konvoluce je typ operace, kdy se na vstup, kterým je pole čísel zvané tenzor, aplikuje menší pole čísel zvané jádro. V každém místě tenzoru se vynásobí a následně sečtou odpovídající hodnoty jádra a tenzoru. Výsledkem je hodnota na příslušné pozici výstupního pole zvaná mapa rysů (feature map). Postup se opakuje při použití více jader, aby se vytvořil takový počet map reprezentujících různé charakteristiky vstupních tenzorů, kolik je jader (Yamashita et al., 2018). Princip konvoluční operace je znázorněn níže na obrázcích číslo 4 a 5.



Obrázek č. 4: Vizuální znázornění konvoluční operace s velikostí jádra 3x3. Na vstupní tenzor (vlevo) je aplikováno jádro (uprostřed) a v každém místě tenzoru je vypočítán prvkový součin mezi každým prvkem jádra a vstupním tenzorem, který se sečte a získá se výstupní hodnota v odpovídající pozici výstupního tenzoru, tzv. mapa rysů (vpravo). Převzato a upraveno podle (Yamashita et al., 2018).



Obrázek č. 5: Detekce okrajů pomocí konvoluce. Mapa rysů (vpravo) se zvýrazněnými okraji je výsledkem konvoluce aplikované na původní obrázek (vlevo). Převzato a upraveno podle (Goodfellow et al., 2016).

Výstupy konvoluce jsou předány aktivační funkci, z nichž nejčastěji používanou je rektifikovaná lineární jednotka (ReLU), která změní záporné hodnoty na 0 a kladné ponechá beze změny (Yamashita et al., 2018). Aktivační funkce se nachází mezi dvěma vrstvami a určuje, která informace má být předána dalšímu neuronu. Každý neuron v neuronové síti přijímá jako vstup výstupní hodnotu neuronů z předchozí vrstvy a zpracovanou hodnotu předává další vrstvě (Li et al., 2021).

4.2.2. Pooling vrstvy

Po konvolučních vrstvách následují pooling vrstvy, které slouží k redukci počtu parametrů. Pooling vrstvy samy o sobě neobsahují žádný učící se parametr. Nejtradičnější formou pooling operace je max pooling, která extrahuje oblasti ze vstupních map rysů a z každé oblasti ponechá pouze maximální hodnotu. Druhým typem je global average pooling, kdy dochází k zprůměrování všech prvků v každé mapě rysů (Yamashita et al., 2018).

4.2.3. Plně propojené vrstvy

Posledními vrstvami jsou takzvané plně propojené vrstvy. V první z plně propojených vrstev dochází ke spojení map rysů do jednorozměrného pole čísel zvaného flatten. Tato vrstva je dále připojena k jedné nebo více plně propojeným vrstvám, v nichž je každý vstup spojen s příslušným výstupem pomocí vah (Yamashita et al., 2018).

Následuje závěrečná klasifikace, která může být provedena např. pomocí funkce softmax, která každé výstupní hodnotě z poslední vrstvy přiřadí pravděpodobnost, s jakou

se hodnota řadí do cílové třídy. Přiřazené hodnoty se pohybují v rozmezí 0 až 1 a součet všech hodnot je 1. Poslední z plně propojených vrstev má obvykle stejný počet výstupních neuronů**,** jako je počet výsledných tříd (Yamashita et al., 2018).

4.3. Trénování neuronových sítí

Učení neuronových sítí se dělí na učení s učitelem a učení bez učitele. Tato práce se zabývá učením s učitelem, což je učení pomocí předem zvolených vstupů, jejichž vytvoření vyžaduje lidský zásah (O'Shea & Nash, 2015). Trénováním rozumíme proces optimalizace parametrů jako jsou jádra a váhy (Yamashita et al., 2018). Nejčastěji používanou metodou při trénování neuronové sítě je algoritmus zpětného šíření (back propagation algorithm). Během trénování je neuronové síti zadán soubor známých vstupních dat a je od ní požadováno, aby získala známý výstup, přičemž její skutečný výstup je následně porovnáván s očekávaným výstupem. Na základě jejich rozdílu se chyba (rozdíl mezi očekávaným výstupem a skutečným výstupem sítě) šíří zpět z výstupní do skryté vrstvy a dále do vstupní vrstvy, přičemž se váhy mezi neurony upravují tak, aby byla chyba minimalizována. Tento cyklus přechodu od vstupu k výstupu a od výstupu ke vstupu se nazývá epocha. Síť prochází epochami tak dlouho, dokud se chyba nenachází v rozmezí určité tolerance (Shiruru, 2016). Rozdílem mezi touto metodou a učením bez učitele je především to, že v případě učení bez učitele trénovací množina neobsahuje referenční výstupy (O'Shea & Nash, 2015).

5. Materiál a metody

5.1. Biologický materiál a použité chemikálie

Pro experimenty byly použity Želvušky druhu *Hypsibius dujardini* poskytnuty společností Sciento. Želvušky byly krmeny řasou *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, která byla poskytnuta Institutem rostlinné fyziologie Ruské akademie věd.

Při testování rezistence želvušek ke stresovým faktorům byla použita minerální voda Volvic (Volvic), Sytox green nucleic acid stain (Invitrogen), peroxid vodíku (Sigma-Aldrich), azid sodný (Sigma-Aldrich).

Pro izolaci RNA želvušek, následný přepis do komplementární DNA a pro RT-PCR byl použit RNeasy mini kit (Qiagen), high capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo fisher), SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Biorad), primery (Generi Biotech), 2-merkaptoethanol (Sigma-Aldrich), 96% ethanol, kapalný dusík.

5.2. Přístrojové a laboratorní vybavení

- Automatické pipety (Eppendorf)
- Automatický mikroskop CV7000 (Yokogawa)
- Centrifuga Jouan BR4I (Trigon-plus)
- Centrifuga Microstar 17R (VWR)
- High capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo fisher)
- Inkubátor Q-cell 2040/40 Basic+ (Pol Lab)
- Konické falkony 15 ml (SPL Life sciences)
- Kultivační láhve T300 (TPP)
- Mikroskop inverzní s fázovým kontrastem Olympus IX70 (Olympus)
- Mikrozkumavky pro PCR 0,2 ml (Biologix)
- Mikrozkumavka 1,5 ml (Eppendorf)
- Mikrozkumavka 2 ml (Eppendorf)
- Minicentrifuga D1008 (Dlab)
- NanoDrop 1000 (Thermo fisher)
- Oscilační mlýn MM400 (Retsch)
- QIAxcel (Qiagen)

- RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- Síťový filtr (Biologix)
- Skleněné kuličky (Biovendor)
- Termocyklér C1000 Touch s nástavbou CFX96 Real-Time systém (Biorad)
- Třepačka Vortex V-1 plus (Biosan)
- Ultrasonická lázeň (VWR)
- 384jamkové desky pro mikroskopii Cell Carrier Ultra (Perkin Elmer)
- 96jamkové desky (TPP)

5.3. Kultivace a odebírání želvušek

Želvušky byly kultivovány v kultivačních lahvích obsahujících minerální vodu Volvic a řasu *Chlorellu vulgaris,* která slouží jako jejich výživa. Povrch lahví byl zdrsněn pomocí pískového papíru, čímž se vytvořily rýhy, za které se v případě absence shluků řas želvušky přichytily. Lahve byly skladovány v inkubátoru při teplotě 17°C.

Při odebírání želvušek bylo kultivačními lahvemi krátce třepáno, aby došlo k rozvolnění shluků řas a následnému přichycení živých želvušek na povrch lahve. Po třepání byla lahev ponechána přibližně 10 minut stát, během této doby se živé želvušky přichytily. Voda z lahví obsahující řasy byla slita a lahve byly doplněny vodou novou. Následně bylo provedeno další třepání lahví, aby došlo k uvolnění želvušek ze stěn a médium bylo slito do kádinky. Poslední krok byl několikrát zopakován, aby bylo dosaženo většího počtu želvušek.

5.4. Testování rezistence k stresovým faktorům

5.4.1. Teplota

Želvušky byly vystavovány zvýšené teplotě pomocí termocykléru C1000 Touch s nástavbou CFX96 Real-Time systém. Testovaná teplota se nacházela v rozmezí od 36,5 °C do 39,5 °C. Vzorky byly po 30, 60, 90 a 120 minutách po 50 µl přeneseny do 384jamkové desky. Každá z jamek obsahovala v průměru 100 želvušek v prvním a 95 želvušek ve druhém provedení experimentu. Do jamek obsahující vzorky želvušek bylo následně přidáno 50 µl 500× naředěného barviva sytox green (ředěno minerální vodou Volvic), čímž bylo dosaženo finálního ředění 1000×. Sytox green je fluorescenční barvivo, které se v případě poškozené buněčné membrány váže na DNA organismu interkalací a umožňuje tak detekci mrtvých

organismů. Pro želvušky není toxické a neovlivňuje jejich životaschopnost (Richaud & Galas, 2018). Deska byla následně změřena pomocí automatického mikroskopu CV7000 ve světelném poli se 3 Z-stacky při vlnových délkách 504/523 nm. Měření probíhalo každých 24 hodin po dobu 4 dnů. Experiment byl pro potvrzení výsledků zopakován s nižší koncentrací sytoxu, kdy bylo k 50 µl želvušek přidáno 50 µl 2000× naředěného sytoxu, aby bylo dosaženo finálního ředění 4000×.

5.4.2. Peroxid vodíku

Z roztoku obsahujícího želvušky bylo malé množství přeneseno do kádinky, kam bylo přidáno takové množství sytoxu, aby došlo k jeho naředění 500×. Z kádinky bylo do 384jamkové desky přeneseno 50 µl na každou jamku. Každá z jamek obsahovala v průměru 95 želvušek v prvním a 52 želvušek ve druhém provedení experimentu. Do desky byla následně přidána koncentrační řada peroxidu vodíku, jehož finální koncentrace se pohybovala v rozmezí 2.22×10^{-3} mM-5 mM (2×a 3× ředěná koncentrační řada o zásobní koncentraci 10 mM a lineárně ředěná koncentrační řada o zásobní koncentraci 8 mM). Výsledné koncentrace peroxidu vodíku znázorňuje tabulka číslo 1. Experiment byl proveden v oktaplikátu. Deska byla dále měřena pomocí automatického mikroskopu CV7000 ve světelném poli se 3 Z-stacky při vlnových délkách 504/523 nm Experiment byl pro potvrzení výsledků zopakován s nižší koncentrací sytoxu, kdy bylo k 50 µl želvušek přidáno 50 µl 2000× naředěného sytoxu, aby bylo dosaženo finálního ředění 4000×.

Tabulka č. 1: Finální koncentrační řada peroxidu vodíku.

Ředění 2× [mM]	**Ředění 3× [mM]**	**Lineární ředění [mM]**
5.00	5.00	4.00
2.50	1.67	3.50
1.25	0.56	3.00
0.63	0.19	2.50
0.31	0.06	2.00
0.16	0.02	1.50
7.75×10^{-2}	6.67×10^{-3}	1.00
3.88×10^{-2}	2.22×10^{-3}	0.50

5.4.3. Azid sodný

Roztok želvušek byl přemístěn do 384jamkové desky v objemu 50 µl na každou jamku. Prvních 6 sloupců obsahovalo v každé jamce průměrně 60 želvušek. Ostatní jamky byly naředěné Volvicem a obsahovaly v průměru 30 želvušek.

V druhé destičce byla připravena koncentrační řada azidu sodného. Finální koncentrace se pohybovala v rozmezí $1{,}51\times10^{-3}$ µM – 49.60 µM (2× ředěná koncentrační řada o zásobní koncentraci 100 µM a 1,5× ředěná koncentrační řada o zásobní koncentraci 40 µM). Do téže destičky bylo aplikováno barvivo sytox green o ředění 1000×, 10 000× a 100 000×. Obsahy jamek byly po 50 µl přenášeny do destičky obsahující želvušky. Deska byla pomocí automatického mikroskopu CV7000 změřena ve světelném poli se 3 Z-stacky při vlnových délkách 504/523 nm.

5.5. Izolace RNA

Z roztoku želvušek byly pomocí síťového filtru odstraněny řasy a vzorky byly inkubovány po dobu 72 hodin při teplotách 4 °C, 17 °C (běžná inkubační teplota) a 30 °C. Experiment byl proveden na populaci 5000-10000 jedinců na jeden vzorek. Pro každou ze tří výše uvedených teplot byl připraven jeden vzorek.

Po inkubaci byl roztok želvušek přenesen do 15 ml konické falkony a centrifugován pomocí centrifugy Jouan BR4I při 1000 G (2400 RPM) po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn, zbylý sediment byl propipetován a 1 ml přenesen do 1,5 ml Eppendorovy zkumavky. Vzorek byl centrifugován při teplotě 24 °C 2 min/10 000 G v centrifuze Microstar 17R a supernatant byl odstraněn. Zbylý obsah zkumavky byl propipetován a přenesen do 2 ml Eppendorovy zkumavky, ke vzorku byly přidány 2 skleněné kuličky očištěné v 96% ethanolu a vzorek byl zmražen pomocí kapalného dusíku a homogenizován v oscilačním mlýnu po dobu 3 minut při frekvenci 30 Hz/1 s. Ke vzorku byl přidán lyzační pufr (součást RNeasy Mini Kitu), ke kterému bylo vedoucím práce před zahájením izolace přidáno 10 µl 2-merkaptoethanolu. Vzorek byl krátce zvortexován, centrifugován pomocí minicentrifugy D1008, zvortexován a vložen na 5 minut do ultrasonické lázně.

K izolaci byl následně použit RNeasy Mini Kit a postupovalo se podle návodu od výrobce. Získaná mediátorová RNA byla po změření koncentrace přepsána do cDNA pomocí High capacity cDNA reverse transcription kitu.

5.6. RT-PCR

Do PCR stripů byly přidány 4 µl vody bez RNÁzy, 2 µl cDNA, 10 µl SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermixu a 4 µl příslušných primerů (seznam použitých primerů je uveden v tabulce číslo 3). Zásobní koncentrace použitých primerů činila 10 µM, po vytvoření primerových párů 1 µM a jejich závěrečná koncentrace ve finální směsi 200 nM. Množství cDNA pro každou reakční směs se pohybovalo v rozmezí 4,5 – 5,5 ng/µl. Následně byla provedena kvantitativní PCR s detekcí v reálném čase pomocí Termocykléru C1000 Touch. Reakce probíhala ve 40 cyklech, na konci každého cyklu byla umožněna vizualizace produktu pomocí interkalačního barviva SYBR green. Přehled teplot a dob trvání při jednotlivých fázích je uveden v tabulce číslo 2.

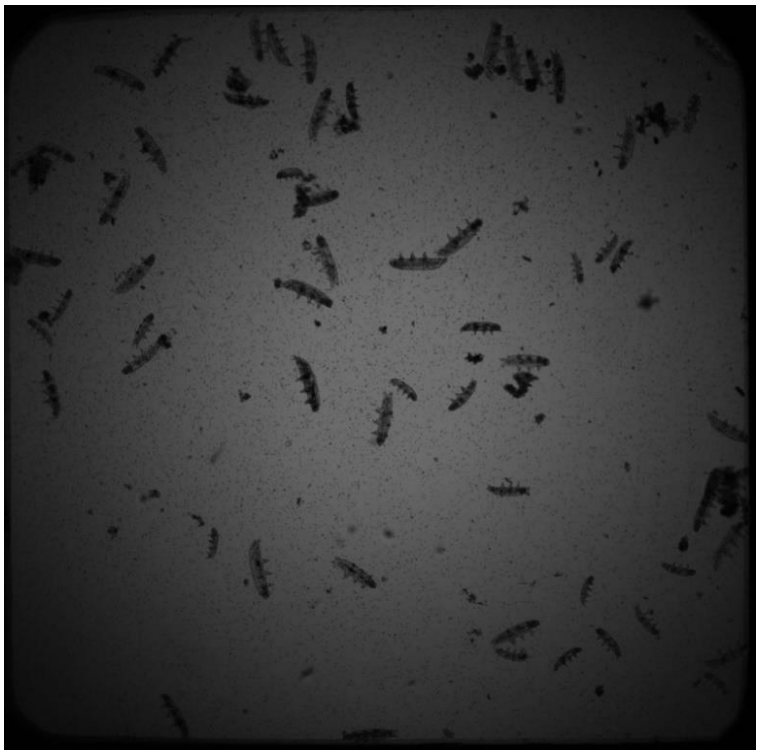
Tabulka č. 2: Jednotlivé fáze RT PCR s odpovídající teplotou, dobou trvání a proběhlými cykly.

Fáze	Teplota [°C]	Čas	Cykly
Denaturace	95	5 min.	1
Denaturace	95	10 sec.	40
Hybridizace + Elongace	61	30 sec.	40

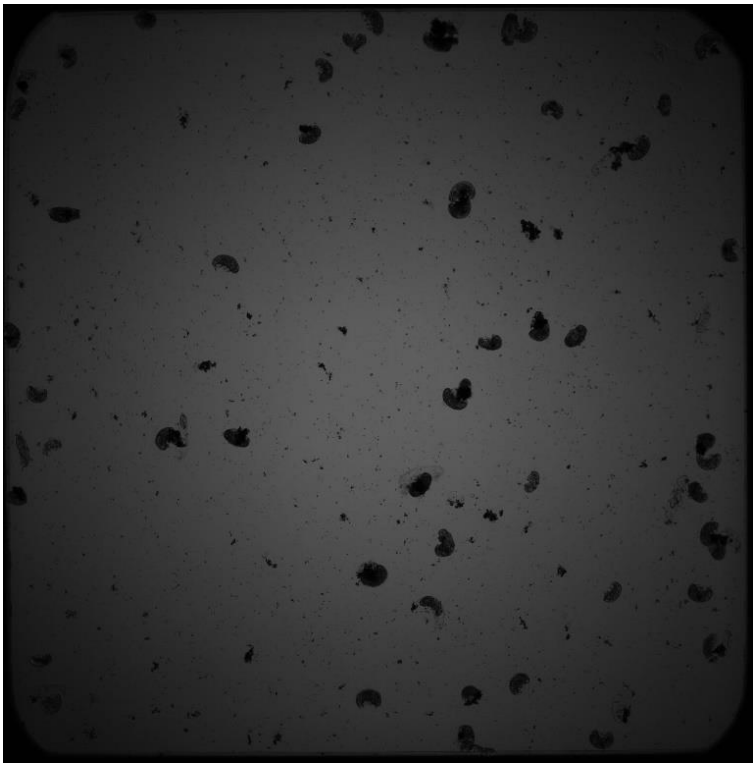
Výsledné produkty byly zanalyzovány pomocí přístroje QIAxcel, při metodě byl použit alignment marker o velikosti 15-1000 bp a velikostní marker o délce 25-500 bp.

5.7. Anotace učebního souboru pro neuronovou síť

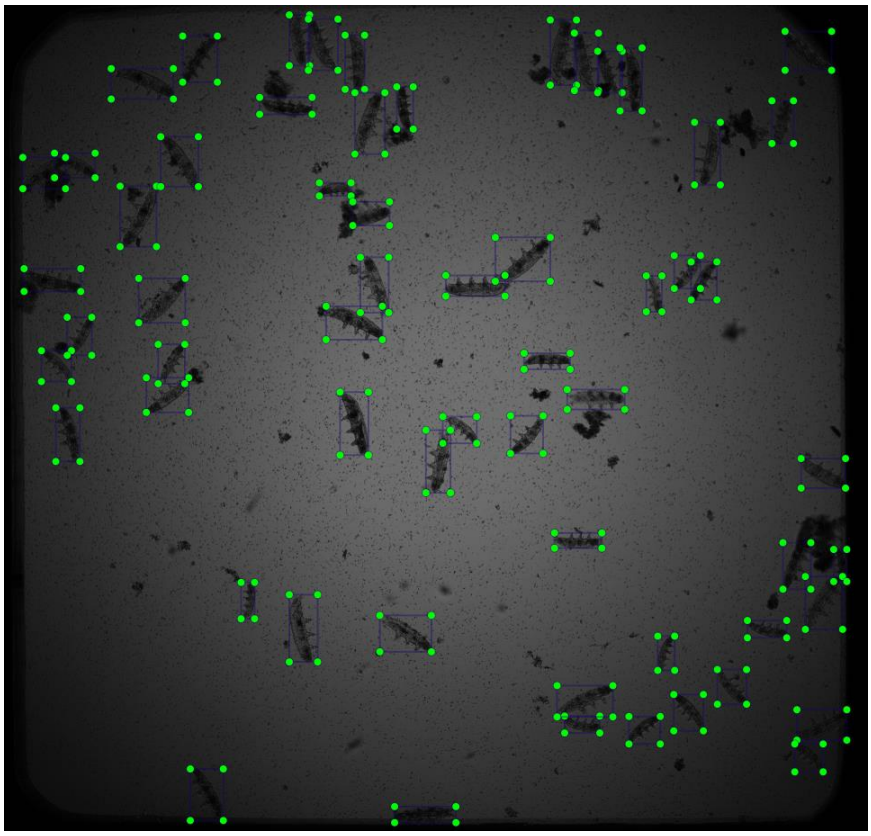
Snímky želvušek pořízeny mikroskopem CV7000 byly anotovány v programu Anaconda Prompt. Želvušky, které vykazovaly natažené tělo a končetiny byly považovány za mrtvé a jedinci s tělem oválného tvaru za živé. Reprezentativní snímky s typickými fenotypy mrtvých a živých želvušek jsou uvedeny na obrázcích 6 a 7. Každý jedinec byl v programu Anaconda Prompt označen rámečkem a rozřazen do dané kategorie (živí/mrtví). Příklad takto označeného snímku uvádí obrázek číslo 8. Kromě živých a mrtvých jedinců se na některých snímcích vyskytovaly také svlečky a vajíčka, které byly rozřazeny do dalších dvou kategorií. Takových snímků ale nebylo mnoho a neočekávali jsme, že by stačily k naučení sítě na rozpoznávání těchto objektů.



Obrázek. č. 6: Snímek mrtvých želvušek druhu *Hyprisibus dujardini* v 384 jamkové desce pořízený automatickým mikroskopem cell voyager CV7000, zvětšení 4×.



Obrázek č. 7: Snímek živých želvušek druhu *Hypsibius dujardini* v 384 jamkové desce pořízený automatickým mikroskopem cell voyager CV7000, zvětšení 4×.



Obrázek č. 8: Snímek mrtvých želvušek druhu *Hypsibius dujardini* v 384 jamkové desce označených pomocí programu Anaconda Prompt, zvětšení 4×.

5.8. Výsledky

5.8.1. Hodnocení rezistence k stresovým faktorům

Želvušky druhu *H. dujardini* byly vystavovány následujícím stresovým faktorům: zvýšená teplota, peroxid vodíku, azid sodný. Po 72 hodinách pro azid sodný a 24 hodinách pro zvýšenou teplotu a peroxid vodíku byl spočítán počet živých a mrtvých jedinců v 384jamkových deskách pomocí snímků z automatického mikroskopu CV7000. Snímky pro zvýšenou teplotu byly vyhodnoceny pomocí neuronové sítě a výsledky jsou rozebrány níže v kapitole 5.8.3. Neuronová síť.

Experiment s peroxidem vodíku byl vyhodnocen ručně. Koncentrace látky, při které došlo k úhynu 50 % jedinců (LD50) byla 6.67 µM, ve všech vyšších koncentracích převažovali mrtví jedinci. Stejným způsobem byly vyhodnoceny snímky želvušek ovlivňovaných azidem sodným, LD50 byla 24.80 µM.

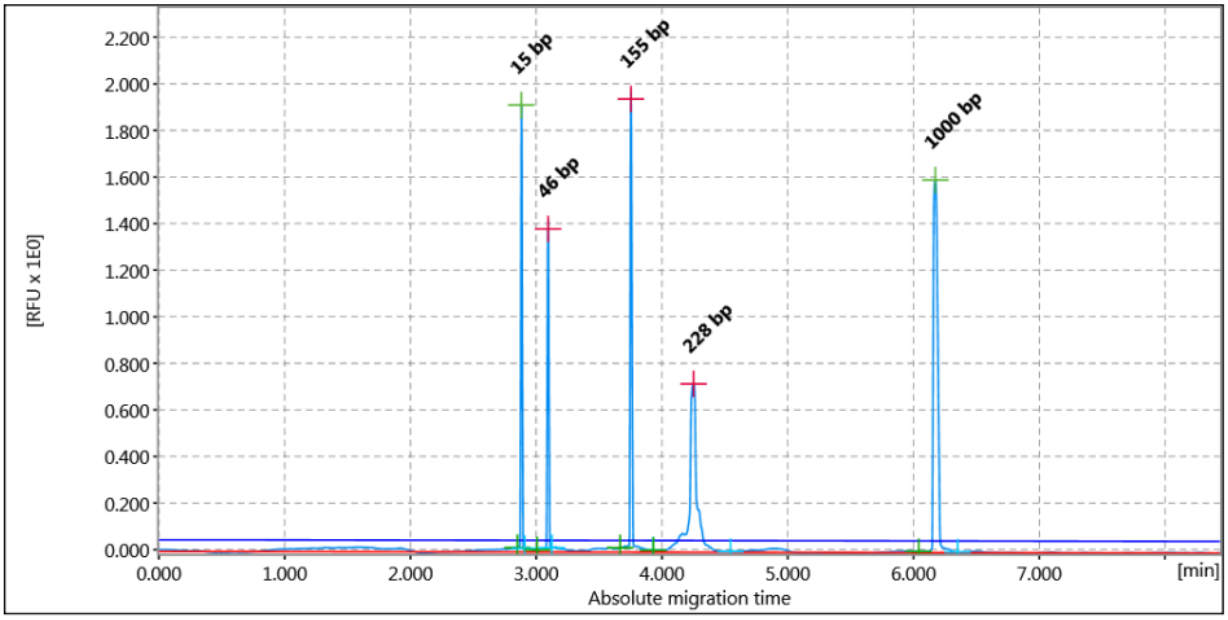
5.8.2. Optimalizace primerových párů

Pro každý z 6 genů byly otestovány 2-4 primerové páry pomocí kvantitativní RT-PCR. A následně bylo pomocí kapilární gelové elektroforézy (QIAxcel) potvrzeno, zda došlo k amplifikaci správného produktu. Příklad znázornění výsledku z QIAxcelu pro jeden z primerových párů uvádí obrázek číslo 8. Vedoucí práce provedl dodatečnou RT-PCR analýzu primerových párů s genomickou DNA, aby bylo možné vyřadit primerové páry, které jsou komplementární k jedinému intronu. Seznam všech testovaných genů a primerových kombinací je uveden v tabulce číslo 3. Pro každý z genů byl vybrán nejvhodnější pár, který byl dále použit pro RT-PCR analýzu vzorků cDNA želvušek inkubovaných ve 4 °C, 17 °C a 30 °C. Výsledné kvantifikační cykly pro dané teploty jsou uvedeny v tabulkách číslo 4-8. Protože byla v experimentu použita 4× menší koncentrace cDNA než při původním testování primerových párů, očekávali jsme vyšší hodnoty kvantifikačních cyklů.

Tabulka č. 3: Seznam testovaných genů o daných primerových kombinacích, jejich odhadovaných a výsledných velikostí, průměrný kvantifikační cyklus (cq) a jeho směrodatná odchylka (SMODCH).

Gen	Kombinace primerů	Odhadovaná velikost [bp]	Výsledná velikost [bp]	Cq	SMODCH	gDNA
XRCC5	1-1	155	155; 228	21.96	0.99	Ano
	2-2	181	-	38.76	1.39	-
	1-2	135	133; 208	21.38	0.92	Ano
	2-1	201	210	24.24	0.56	Ne
PCNA	1-1	187	200	26.27	0.31	Ne
	2-2	208	221	27.06	0.06	Ne
	1-2	189	216	26.84	0.25	Ne
	2-1	206	202	26.65	0.10	Ne
PARP2	1-1	90	95	26.32	0.28	Ne
	2-2	123	128	25.47	0.07	Ano
	2-1	199	210	25.73	0.29	Ne
RPL-19	1-1	90	91	21.10	0.12	Ano
	2-2	104	106	21.14	0.34	Ne
	1-2	169	182	22.93	0.26	Ano
	2-1	25	-	-	-	-
18S	1-1	222	233	4.63	0.42	Ne
	2-2	185	196	4.12	0.66	Ne
	1-2	168	174	4.56	0.46	Ne
	2-1	239	247	4.40	0.41	Ne
BRCA1	1-1	146	152	25.35	0.14	Ano
	2-1	198	207	25.81	0.14	Ano

Z testovaných primerových párů se jako vhodný pro další analýzu jevil pro gen XRCC5 pár 2-1. U genu PCNA byly vhodné všechny páry kromě 1-2 a k experimentu byl použit pár 1-1. Pro gen PARP2 byly vhodné páry 1-1 a 2-1, přičemž k další analýze byl vybrán pár 1-1. Gen RPL-19 měl jediný přijatelný pár 2-2. V případě genu 18S byly vhodné všechny páry a byl použit pár 1-1, naopak u BRCA1 nebyl vhodný ani jeden, tudíž jsme tento gen z další analýzy vyřadili.



Obrázek č. 8: Příklad elektroforetogramu pro gen XRCC5 (1-1) z přístroje QIAxcel. Prvním píkem (15bp) je alignment marker. Druhým píkem (46 bp) je primerový dimer, který vzniká vždy při použití barviva SYBR green v této metodě. Třetím píkem (155 bp) je hledaný produkt a následující pík o velikosti 228 znázorňuje falešnou amplifikaci. Posledním píkem (1000 bp) je alignment marker.

Tabulka č. 4: Kvantifikační cykly a směrodatné odchylky při daných teplotách pro gen XRCC5 (2-1) ve vzorku obsahujícím cDNA želvušek *Hypsibius dujardini*.

Teplota	**Kvantifikační cyklus**	**Průměr**	**Směrodatná odchylka**
4 °C	27.89; 27.72; 27.54; 27.68	27.70	0.13
17 °C	27.49; 27.13; 27.67; 27.00	27.32	0.27
30 °C	26.33; 27.38; 26.96; 27.10	26.94	0.39

Pro gen XRCC5, pár primerů 2-1, byl průměrný kvantifikační cyklus pro 4 °C 27.70 se směrodatnou odchylkou 0.13, pro 17 °C 27.32 se směrodatnou odchylkou 0.27 a pro 30 °C 26.94 se směrodatnou odchylkou 0.39.

Tabulka č. 5: Kvantifikační cykly a směrodatné odchylky při daných teplotách pro gen PCNA (1-1) ve vzorku obsahujícím cDNA želvušek *Hypsibius dujardini*.

Teplota	Kvantifikační cyklus	Průměr	Směrodatná odchylka
4 °C	30.59; 30.95; 30.55; 31.00	30.77	0.20
17 °C	29.71; 29.73; 29.21; 29.22	29.47	0.25
30 °C	31.18; 31.91; 30.81; 30.94	31.21	0.43

Pro gen PCNA, pár primerů 1-1, byl průměrný kvantifikační cyklus pro 4 °C 30.77 se směrodatnou odchylkou 0.20, pro 17 °C 29.47 se směrodatnou odchylkou 0.25 a pro 30 °C 31.21 se směrodatnou odchylkou 0.43.

Tabulka č. 6: Kvantifikační cykly a směrodatné odchylky při daných teplotách pro gen PARP2 (1-1) ve vzorku obsahujícím cDNA želvušek *Hypsibius dujardini*.

Teplota	Kvantifikační cyklus	Průměr	Směrodatná odchylka
4 °C	29.40; 29.67; 29.21; 29.21	29.37	0.19
17 °C	28.51; 28.28; 29.39; 28.30	28.62	0.46
30 °C	29.15; 29.59; 29.09; 28.76	29.15	0.30

Pro gen PARP2, pár primerů 1-1, byl průměrný kvantifikační cyklus pro 4 °C 29.37 se směrodatnou odchylkou 0.19, pro 17 °C 28.62 se směrodatnou odchylkou 0.46 a pro 30 °C 29.15 se směrodatnou odchylkou 0.30.

Tabulka č. 7: Kvantifikační cykly a směrodatné odchylky při daných teplotách pro gen RPL-19 (2-2) ve vzorku obsahujícím cDNA želvušek *Hypsibius dujardini*.

Teplota	Kvantifikační cyklus	Průměr	Směrodatná odchylka
4 °C	24.54; 24.82; 24.27; 24.43	24.51	0.20
17 °C	24.34; 23.75; 23.71; 24.00	23.95	0.25
30 °C	26.53; 26.83; 26.03; 26.05	26.36	0.33

Pro gen RPL-19, pár primerů 2-2, byl průměrný kvantifikační cyklus pro 4 °C 24.51 se směrodatnou odchylkou 0.20, pro 17 °C 23.95 se směrodatnou odchylkou 0.25 a pro 30 °C 26.36 se směrodatnou odchylkou 0.33.

Tabulka č. 8: Kvantifikační cykly a směrodatné odchylky při daných teplotách pro gen 18S (1-1) ve vzorku obsahujícím cDNA želvušek *Hypsibius dujardini.*

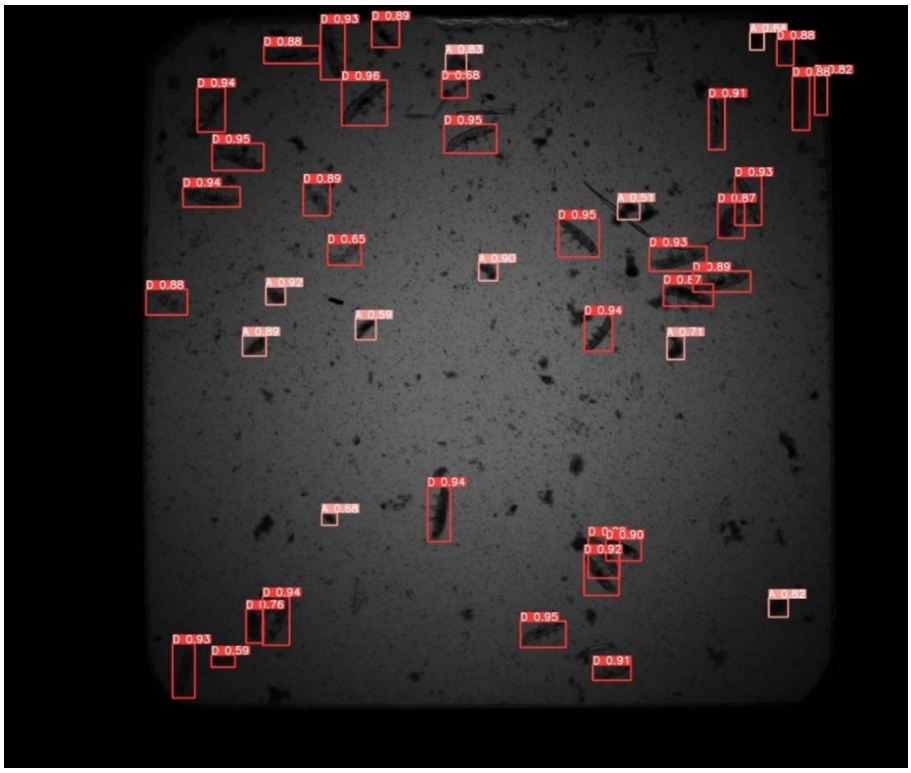
Teplota	Kvantifikační cyklus	Průměr	Směrodatná odchylka
4 °C	8.86; 9.16; 8.72; 9.02	8.94	0.17
17 °C	9.76; 9.77; 9.19; 9.10	9.45	0.31
30 °C	10.98; 11.66; 10.54; 10.52	10.92	0.46

Pro gen 18S, pár primerů 1-1, byl průměrný kvantifikační cyklus pro 4 °C 8.94 se směrodatnou odchylkou 0.17, pro 17 °C 9.45 se směrodatnou odchylkou 0.3 a pro 30 °C 10.92 se směrodatnou odchylkou 0.46.

5.8.3. Neuronová síť

Příprava neuronové sítě z anotovaných snímků byla provedena Mgr. Jiřím Vollerem, Ph.D. Použitý typ neuronové sítě je YOLOv5 large implementovaná při základních parametrech v aplikačním rámci PyTorch s užitou šířkou obrázků 640 pixelů. Počítáno na grafickém procesoru s přístupem Tesla P100-PCIE přes Google Colab.

Pro predikci výsledků experimentu s teplotním stresem byla použita síť učena 311 epoch s přesností a spolehlivostí na validační sadě nad 95 %. Na obrázku číslo 9 jde vidět, že síť je schopná rozlišovat dvě třídy želvušek – živé a mrtvé. Síť nezvládala rozpoznávat svlečky a vajíčka, což bylo způsobeno nedostatkem anotovaných příkladů v učícím setu. Při teplotním experimentu byla každá z teplot měřena pouze v duplikátu a experiment sloužil především k ověření funkčnosti neuronové sítě. Pro každý ze snímků byly pořízeny 3 Z-stacky, kdy byly kombinovány 3 snímky pořízené v různých ohniskových vzdálenostech. Neuronová síť zaznamenala mírné rozdíly mezi jednotlivými Z-stacky a v některých zaostřeních nezvládla identifikovat želvušky. Rozdíly mezi jednotlivými Z stacky můžeme vidět na grafech číslo 1-4. Grafy byly zpracovány v programu GraphPad Prism 9.4.1



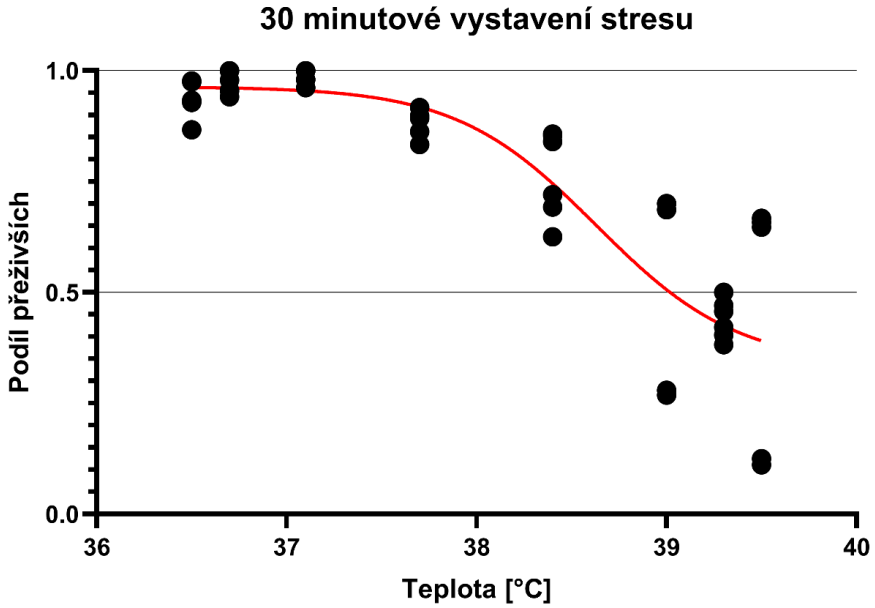
Obrázek č. 9: Snímek pořízený automatickým mikroskopem Cell Voyager CV7000 vyhodnocený zhotovenou neuronovou sítí. Mrtvé želvušky značené červeným rámečkem a písmenem D, živé želvušky značené růžovým rámečkem a písmenem A. Čísla značí míru důvěry odhadu objektu neuronové sítě. Zvětšení 4×.

Tabulka č. 9: Hodnoty LT50 vypočtené nelineární regresí z výsledků odhadnutých neuronovou sítí po expozici *H. dujardini* teplotnímu stresu.

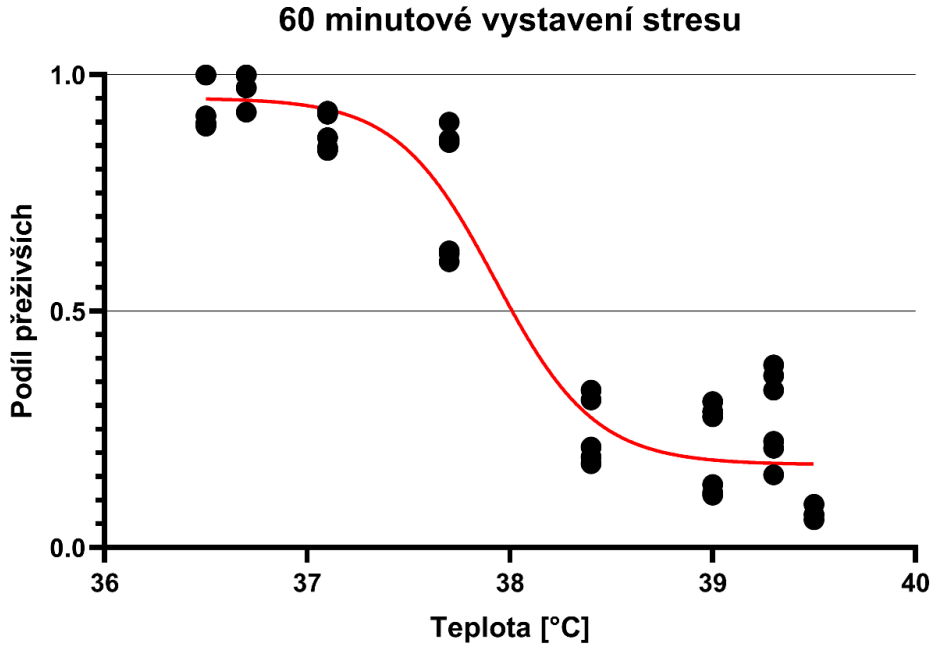
Doba expozice [min.]	**LT50 [°C]**
30	38.64
60	37.93
90	37.75
120	37.09

Teplota, při které došlo k úhynu 50 % jedinců ve vzorku (LT50) pro zvýšenou teplotu působící 30 minut činila 38.64 °C, pro zvýšenou teplotu působící 60 minut 37.93 °C, pro zvýšenou teplotu působící 90 minut 37.75 °C a pro zvýšenou teplotu působící 120 minut 37.09 °C.

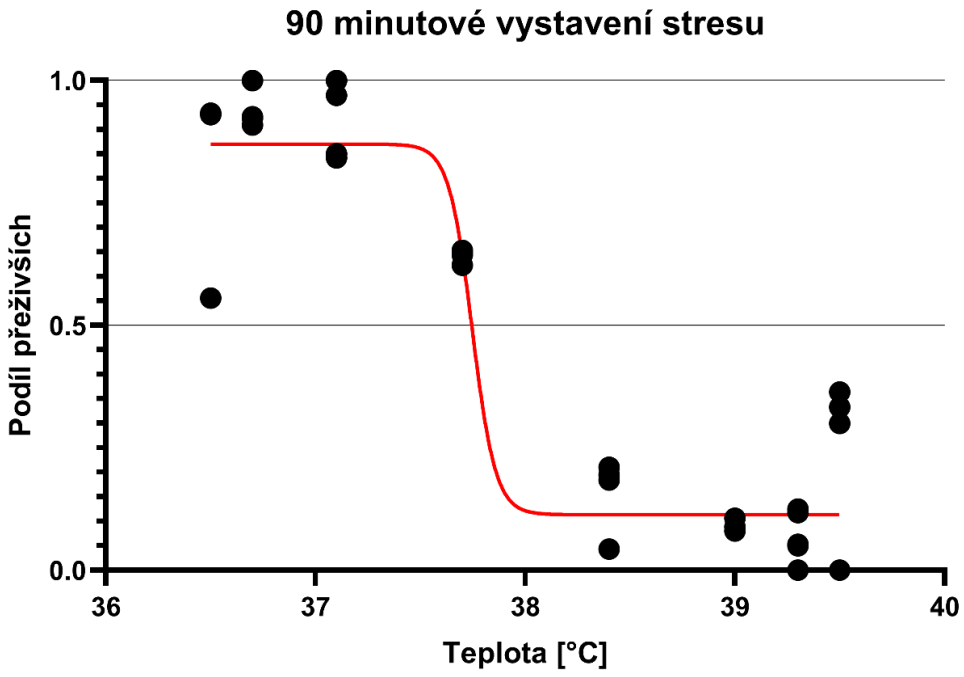
Graf č. 1: Podíl přeživších želvušek po vystavení teplotnímu stresu po dobu 30 minut. Vyhodnoceno neuronovou sítí z duplikátního vzorku s 3 Z-stacky. Proloženo regresivní křivkou (červená).



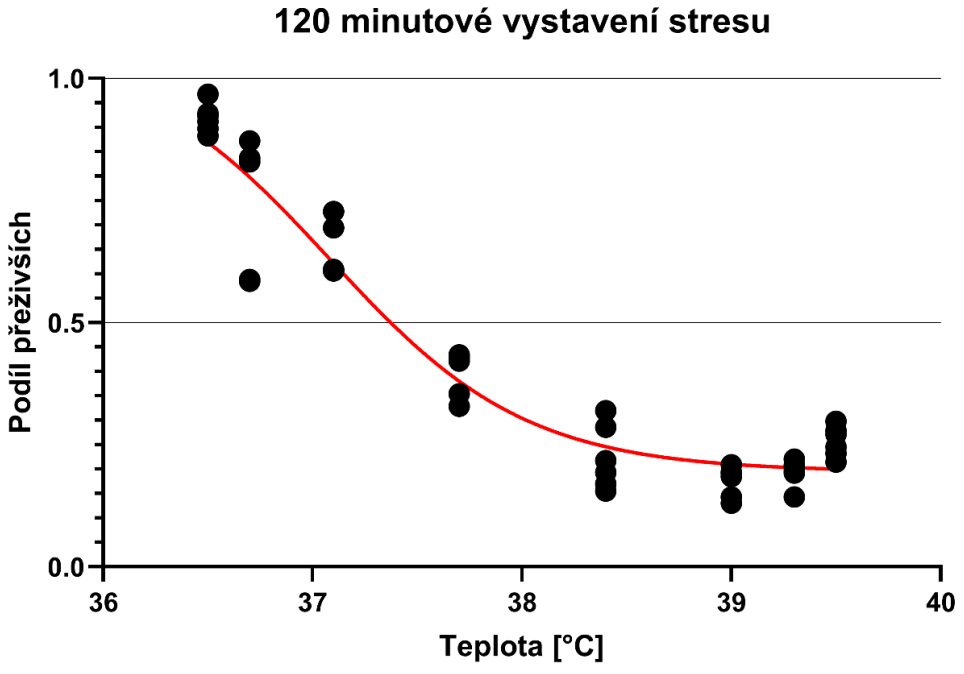
Graf č. 2: Podíl přeživších želvušek po vystavení teplotnímu stresu po dobu 60 minut. Vyhodnoceno neuronovou sítí z duplikátního vzorku s 3 Z-stacky. Proloženo regresivní křivkou (červená).



Graf č. 3: Podíl přeživších želvušek po vystavení teplotnímu stresu po dobu 90 minut. Vyhodnoceno neuronovou sítí z duplikátního vzorku s 3 Z-stacky. Proloženo regresivní křivkou (červená).



Graf č. 4: Podíl přeživších želvušek po vystavení teplotnímu stresu po dobu 120 minut. Vyhodnoceno neuronovou sítí z duplikátního vzorku s 3 Z-stacky. Proloženo regresivní křivkou (červená).



5.9. Diskuze

Pro gen XRCC5 byl jediným vhodným primerovým párem pár 2-1, u kterého nedocházelo k amplifikaci gDNA. U párů 1-1 a 1-2 došlo kromě amplifikace gDNA také ke vzniku nespecifického produktu, a páry byly vyhodnoceny jako nevhodné. U genu PCNA nedocházelo k amplifikaci gDNA v žádném z testovaných párů, nicméně v kombinaci 1-2 byl příliš velký rozdíl mezi očekávanou a skutečnou velikostí produktu, což naznačuje, že docházelo k amplifikaci jiného produktu. Pár byl tedy vyhodnocen jako nepoužitelný a k následné analýze byla vybrána kombinace 1-1, u které docházelo k nejrychlejší amplifikaci. U genu PARP2 došlo k amplifikaci gDNA pouze v případě páru 2-2, ostatní páry byly přijatelné. U genu RPL-19 byl jediným párem, kde nedocházelo k amplifikaci gDNA 2-2. Pro gen 18S byly vhodné všechny z testovaných párů a pro gen BRCA1 nebyl k další analýze vybrán žádný pár, protože u všech docházelo k amplifikaci gDNA a analýza by vyžadovala dodatečné přečištění izolované RNA. Vzhledem k malému množství RNA, které je získáno při izolacích z želvušek a dlouhou dobu, která je potřeba pro kultivaci populace, je vhodné se vyhýbat krokům, které mohou vést ke ztrátě RNA.

U genů 18S a RPL-19 docházelo k pozdější amplifikaci v případě kultivační teploty 30 °C, zatímco mezi teplotami 4 °C a 17 °C nebyly pozorovány velké rozdíly. Oba tyto geny patří mezi tzv. housekeeping geny, které jsou nezbytné ke správnému fungování organismu (např. mitochondriální geny, geny pro ATPázy nebo geny histonů). Snížená aktivita těchto genů při zvýšené teplotě může být přisuzována změně metabolismu a přípravě na kviescenci, podobný proces byl popsán u želvušky *Ramazzottius varieornatus* (Neves et al., 2022). V případě XRCC5, PARP2 a PCNA lze u některých kultivačních teplot pozorovat dřívější amplifikace, což by mohlo znamenat změny v expresi těchto genů. Protože se všechny tyto geny podílí na opravných mechanismech, jejich exprese by mohla znamenat poškození DNA při daných teplotách. Nicméně tyto rozdíly v kvantifikačních cyklech nejsou dostatečně velké a výsledky by měly být ověřeny, což v našem případě nebylo možné z důvodu nedostatku biologického materiálu.

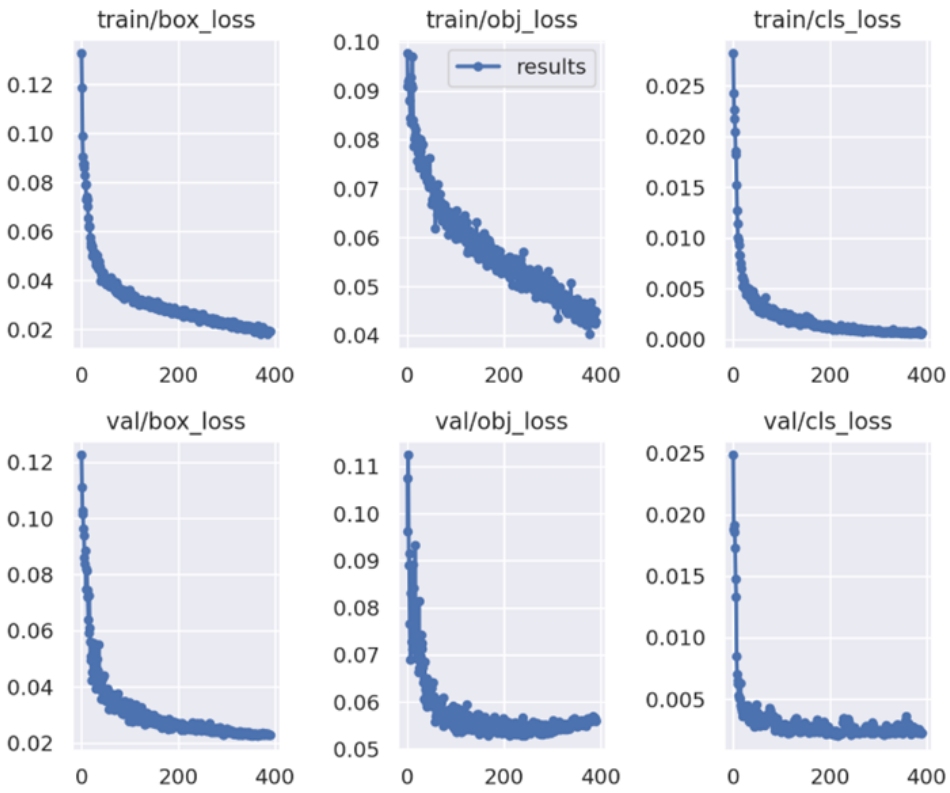
Výsledky testování rezistence ke zvýšené teplotě nedopadly podle očekávání. Obdobný experiment byl prováděn Mgr. Janou Lušňákovou, která ve své práci (Lušňáková, 2020) uvádí všechny hodnoty přesahující 38 °C, což v našem případě nastalo pouze u vzorku s expozicí 30 minut. Nižší hodnoty v našem experimentu mohly být způsobeny malým počtem opakování experimentu, nebo použitím kultury, která kvůli nedostatku řas projevovala známky hladovění. Želvušky mohly být tedy citlivější vůči

stresovým faktorům, což se potvrdilo i v experimentu s oxidativním stresem, kdy LD50 pro peroxid vodíku činila 6.67 µM, zatímco práce Mgr. Lušňákové uvádí 1.583 mM. Kultury vykazovaly větší odolnost vůči azidu sodnému, kdy po 72hodinové expozici činila LD50 24.80 µM.

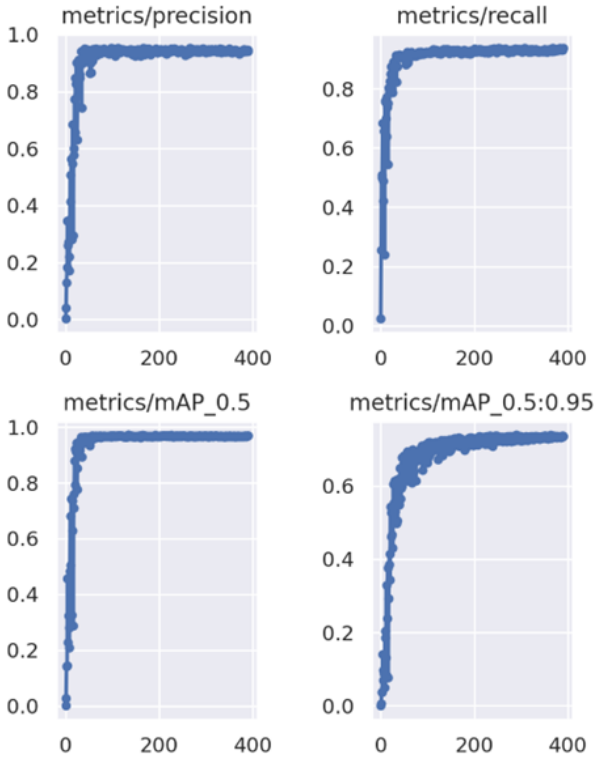
Anotované snímky želvušek přispěly k vytvoření neuronové sítě, která se naučila rozpoznávat a označovat živé a mrtvé želvušky s přesností nad 95 % a byla dále použita k vyhodnocení experimentu rezistence želvušek vůči vysoké teplotě. Síť nedokázala rozpoznávat svlečky a vajíčka, což bylo způsobeno malým počtem učících souborů obsahující snímky s těmito objekty. Pro finální anotaci byla užita síť z epochy 311, jejíž parametry jsou popsány v tabulce číslo 10. Vývoj neuronové sítě je poté vizualizován v obrázcích číslo 10 a 11.

Tabulka č. 10: Parametry užité neuronové sítě; Přesnost udává, jak dobře dokáže síť detekovat pouze relevantní objekty. Spolehlivost vypovídá, s jakou pravděpodobností neuronová síť detekuje všechny relevantní objekty na snímku. mAP@.5 a mAP@.5:.95 jsou hodnoty průměrné přesnosti udávající celkovou kvalitu sítě. Lze je definovat jako plochu pod křivkou funkce přesnosti a spolehlivosti s určeným prahem detekce objektů. Pro mAP@.5 je prah detekce 50 % (značka umístěná neuronovou sítí pokrývá alespoň 50 % relevantního objektu). mAP@.5:.95 je potom průměrem průměrných přesností s prahem detekce 50 až 95 % (po intervalech 5%).

Třída	Počet snímků	Počet značek (objektů)	Přesnost	Spolehlivost	mAP@.5	mAP@.5:.95
Celkem	130	3545	0.944	0.928	0.97	0.739
Mrtvé želvušky	130	1213	0.954	0.941	0.979	0.757
Živé želvušky	130	2332	0.935	0.916	0.961	0.72



Obrázek č. 10: Parametry učení neuronové sítě po 400 epoch, loss metriky.



Obrázek č. 11: Parametry učení neuronové sítě po 400 epoch, precision, recall, mAP metriky.

5.10. Závěr

V rámci teoretické části této práce byla zpracována literární rešerše, jejíž součástí byla charakteristika želvušek a jejich schopnosti rezistence vůči stresovým faktorům. Rešerše dále obsahovala popis neuronových sítí a jejich využití.

V experimentální části byly želvušky druhu *Hypsibius dujardini* vystavovány zvýšené teplotě, oxidativnímu stresu a azidu sodnému. Pomocí anotovaných snímků živých a mrtvých želvušek byla vytvořena neuronová síť, která dokázala s přesností nad 95 % rozpoznat živé a mrtvé želvušky a byla následně použita k vyhodnocení experimentu se zvýšenou teplotou. Hodnoty LT50 se pohybovaly v rozmezí 37.09 °C – 38.64 °C v závislosti na době expozice. Při experimentu testujícím rezistenci želvušek vůči oxidativnímu stresu byl jako zdroj ROS použit peroxid vodíku. Během tohoto pokusu byly použity nevhodné kultury, které byly pravděpodobně v důsledku hladovění příliš citlivé na stresové faktory a experiment nebyl vyhodnocen pomocí neuronové sítě. Hodnoty LD50 pro tento experiment činily 6.67 µM. Posledním testovaným stresorem byl azid sodný, který byl stejně jako oxidativní stres vyhodnocen ručně z pořízených snímků. Hodnoty LD50 pro azid sodný činily 24.80 µM.

Dále byly v experimentální části optimalizovány primery pro geny XRCC5, PCNA, PARP2, RPLS-19, 18S a BRCA1. S výjimkou BRCA1 byly nalezeny vhodné páry pro všechny z použitých genů. Zoptimalizované primery byly následně použity ke zhodnocení exprese genů populace želvušek, které byly inkubovány při 4 °C, 17 °C a 30 °C. U genů 18S a RPL-19, které patří mezi housekeeping geny, byla pozorována snížená aktivita při teplotě 30 °C, což může značit změnu metabolismu a přípravu na kviescenci. U genů XRCC5, PARP2 a PCNA byly v některých případech pozorovány možné změny exprese při různých teplotách, ale výsledky nebyly dostatečně jednoznačné.

6. Použitá literatura

Crowe, J. H., & Cooper, A. F. (1971). CRYPTOBIOSIS. *Source: Scientific American*, *225*(6), 30–37.

Ertel, W. (2017). *Undergraduate Topics in Computer Science Introduction to Artificial Intelligence*.

Förster, F., Liang, C., Shkumatov, A., Beisser, D., Engelmann, J. C., Schnölzer, M., Frohme, M., Müller, T., Schill, R. O., & Dandekar, T. (2009). Tardigrade workbench: Comparing stress-related proteins, sequence-similar and functional protein clusters as well as RNA elements in tardigrades. *BMC Genomics, 10*, 469.

Glime, J. M. 2017. Tardigrade Survival. Chapt. 5-1. In: Glime, J. M. Bryophyte Ecology. Volume 2. Bryological Interaction. Ebook 5-1-1 sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. Last updated 18 July 2020 and available at https://digitalcommons.mtu.edu/bryophyte-ecology2/

Goodfellow, I., Bengio, Y., & Courville, A. (2016). *Deep Learning*. MIT Press.

Gross, V., Müller, M., Hehn, L., Ferstl, S., Allner, S., Dierolf, M., Achterhold, K., Mayer, G., & Pfeiffer, F. (2019). X-ray imaging of a water bear offers a new look at tardigrade internal anatomy. *Zoological Letters*, *5*(1).

Gross, V., Treffkorn, S., & Mayer, G. (2015). Tardigrada. In *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 3: Ecdysozoa I: Non-Tetraconata* (pp. 35–52). Springer-Verlag Vienna.

Guidetti, R., Altiero, T., & Rebecchi, L. (2011). On dormancy strategies in tardigrades. In *Journal of Insect Physiology* (Vol. 57, Issue 5, pp. 567–576).

Guidetti, R., Boschini, D., Altiero, T., Bertolani, R., & Rebecchi, L. (2008). Diapause in tardigrades: A study of factors involved in encystment. *Journal of Experimental Biology*, *211*(14), 2296–2302.

Kusumoto, D., & Yuasa, S. (2019). The application of convolutional neural network to stem cell biology. In *Inflammation and Regeneration* (Vol. 39, Issue 1). BioMed Central Ltd.

Li, Z., Liu, F., Yang, W., Peng, S., & Zhou, J. (2021). A Survey of Convolutional Neural Networks: Analysis, Applications, and Prospects. *IEEE Transactions on Neural Networks and Learning Systems*, 1–21.

Lušňáková, Jana. Studium odpovědi *Hypsibius dujardini* na stres. Olomouc, 2020. bakalářská práce (Bc.). Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta

Møbjerg, N., Halberg, K. A., Jørgensen, A., Persson, D., Bjørn, M., Ramløv, H., & Kristensen, R. M. (2011). Survival in extreme environments - on the current knowledge of adaptations in tardigrades. In *Acta physiologica (Oxford, England)* (Vol. 202, Issue 3, pp. 409–420).

Møbjerg, N., & Neves, R. C. (2021). New insights into survival strategies of tardigrades. In *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology* (Vol. 254). Elsevier Inc.

Nelson, D. R., Bartels, P. J., & Guil, N. (2018). *Tardigrade Ecology* (pp. 163–210).

Nelson, D. R., Guidetti, R., & Rebecchi, L. (2010). Tardigrada. In *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates* (pp. 455–484). Elsevier Inc.

Nelson, D. R., Guidetti, R., & Rebecchi, L. (2015). Phylum Tardigrada. In *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates: Ecology and General Biology: Fourth Edition* (Vol. 1, pp. 347–380). Elsevier Inc.

Neves, R. C., Møbjerg, A., Kodama, M., Ramos-Madrigal, J., Gilbert, M. T. P., & Møbjerg, N. (2022). Differential expression profiling of heat stressed tardigrades reveals major shift in the transcriptome. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, *267*.

Nielsen, M. (2015). *Neural Networks and Deep Learning*.

O'Shea, K., & Nash, R. (2015). *An Introduction to Convolutional Neural Networks*.

Ramløv, H., & Westh, P. (1992). Survival of the Cryptobiotic Eutardigrade Adorybiotus coronifer during Cooling to-196°C: Effect of Cooling Rate, Trehalose Level, and Short-Term Acclimation. In *CRYOBIOLOGY* (Vol. 29).

Ramløv, H., & Westh, P. (2001). *Cryptobiosis in the Eutardigrade Adorybiotus (Richtersius) coronifer: Tolerance to Alcohols, Temperature and de novo Protein Synthesis*.

Rebecchi, L. (2013). Dry up and survive: The role of antioxidant defences in anhydrobiotic organisms. *Journal of Limnology*, *72*(SUPPL 1), 62–72.

Rebecchi, L., Altiero, T., & Guidetti, R. (2007). *Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance Sperm Evolution in Tardigrades View project FEBS Fellowship View project*.

Richaud, M., & Galas, S. (2018). Defining the viability of tardigrades with a molecular sensor related to death. *PLoS ONE*, *13*(10).

Shiruru, K. (2016). An introduction to artificial neural network. *Shiruru, Kuldeep. (2016). AN INTRODUCTIONInternational Journal of Advance Research and Innovative Ideas in Education*, 27–30.

Tenlen, J. R., McCaskill, S., & Goldstein, B. (2013). RNA interference can be used to disrupt gene function in tardigrades. *Development Genes and Evolution*, *223*(3), 171–181.

Wang, C., Grohme, M. A., Mali, B., Schil, R. O., & Frohme, M. (2014). Towards decrypting cryptobiosis - Analyzing anhydrobiosis in the tardigrade Milnesium tardigradum using transcriptome sequencing. *PLoS ONE*, *9*(3).

Wang, S. (2003). *Interdisciplinary Computing in Java Programming || Artificial Neural Network. (Chapter 5)*.

Weronika, E., & Łukasz, K. (2017). Tardigrades in Space Research - Past and Future. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, *47*(4), 545–553.

William R. Miller. (1997) Tardigrades: Bears of the moss. EMPORIA STATE UNIVERSITY, vol 43

Wright, J. C. (2001). Cryptobiosis 300 Years on from van Leuwenhoek: What Have We Learned about Tardigrades? In *Zool. Anz* (Vol. 240).

Yamashita, R., Nishio, M., Do, R. K. G., & Togashi, K. (2018). Convolutional neural networks: an overview and application in radiology. In *Insights into Imaging* (Vol. 9, Issue 4, pp. 611–629). Springer Verlag.

7. Přílohy

Tabulka č. 11: Seznam a struktura použitých primerů.

Gen	Kombinace primerů	Primer F	Primer R
XRCC5	1-1	GCGACTGATCTCGGTGATGCGTGA	AGTGTGATTTTGCGTTCAACCAGCTT
	2-2	GGCGAAGGACTTGATTTACAGCTTTG	CAGCTTGCTCCAAACGATGTCCAG
	1-2	GCGACTGATCTCGGTGATGCGTGA	CAGCTTGCTCCAAACGATGTCCAG
	2-1	GGCGAAGGACTTGATTTACAGCTTTG	AGTGTGATTTTGCGTTCAACCAGCTT
PCNA	1-1	CAGATTCGACTAAGCGAACGGAGCA	GAATCGGATATTCCAGGCACAGGGG
	2-2	CGGTGACATCGGGAAAGGTCAGATT	GGGAATCGGATATTCCAGGCACAGG
	1-2	CAGATTCGACTAAGCGAACGGAGCA	GGGAATCGGATATTCCAGGCACAGG
	2-1	CGGTGACATCGGGAAAGGTCAGATT	GAATCGGATATTCCAGGCACAGGGG
PARP2	1-1	GACTCAGACAAGCCTGAAGAACCGAA	TGGTTCAGGAGCTTCTTCAACAAGGG
	2-2	CCGTCCGAAACGAGCTCTGAAAAAT	GGCTTGTCTGAGTCGGCGTTCTTC
	2-1	CCGTCCGAAACGAGCTCTGAAAAAT	TGGTTCAGGAGCTTCTTCAACAAGGG
RPL-19	1-1	TAACGTTTTCCGAAACAAGCGCGTC	GCTTGGTCTGAAAGTTGCTTGGAGC
	2-2	GCTCCAAGCAACTTTCAGACCAAGC	CACCAACGCTTTCTGCTTCTTCACC
	1-2	TAACGTTTTCCGAAACAAGCGCGTC	CACCAACGCTTTCTGCTTCTTCACC
	2-1	GCTCCAAGCAACTTTCAGACCAAGC	GCTTGGTCTGAAAGTTGCTTGGAGC
18S	1-1	GTTATTTGCCCAAGACCAATCCGGC	CCTTCCTTGGATGTGGTAGCCGTTT
	2-2	CTCGTGGAGCGGACGCAGTTATTTG	GACACTCCGTTACCCGTAAAAGCCT
	1-2	GTTATTTGCCCAAGACCAATCCGGC	GACACTCCGTTACCCGTAAAAGCCT
	2-1	CTCGTGGAGCGGACGCAGTTATTTG	CCTTCCTTGGATGTGGTAGCCGTTT
BRCA1	1-1	CTCGTCGATCGTGTCGGAGAAGTTG	TGTCTGCCTTCGCTTCTTCATCACC
	2-1	GCTTGTCGCGAGCTTCATTTACCAA	TGTCTGCCTTCGCTTCTTCATCACC